УДК: 616-053.2, 618, 616.98-055.2-053.2:614.2+616-058(477)
УКПП 86.9
№ держреєстрації 0121U110277
інв. №

Національна Академія медичних наук України
Державна установа "Інститут педіатрії, акушерства і гінекології
ім. академіка О.М. Лук'янової НАМН України"
(ДУ "ІПАГ ім. академіка О.М. Лук'янової НАМНУ")
04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 8
тел. (044) 483-80-67, 483-61-16, факс (044) 483-16-70

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ДУ "ІПАГ ім. академіка
О.М. Лук'янової НАМН України"
Академік НАМН України
_____ Ю.Г. Антипкін
«14» грудня 2021 р.

ЗВІТ
про науково-дослідну роботу
за договорами від 03 листопада 2020 року № 147/01.2020
та від 14 травня 2021 року № 178/01/0188

ДОСЛІДИТИ ЗНАЧЕННЯ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ТА СОЦІОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ В ПОШИРЕННІ КОРОНАВІРУСНОГО ІНФІКУВАННЯ СЕРЕД ЖІНОК ТА ДІТЕЙ В УКРАЇНІ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(заключний)

Керівник НДР:
Керівник відділення
"Проблем здоров'я жінок
фертильного віку"
д-р мед. наук, професор В.В. Подольський

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ДУ «ІПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України», протокол від 14 грудня 2021 р. № 13

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР:		В.В. Подольський
Керівник від-ня проблем здоров'я жінки фертильного віку, д-р мед. наук, професор	2020.12	(реферат, розд. 1, висновки)
	2021.08	(реферат, розд. 1, висновки)
	2021.12	(реферат, розд. 1, висновки)
Виконавець НДР:		Ю.Г Антипкін
Директор інституту, академік НАМН України, д-р мед наук, професор	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2,)
	2021.08	(розд. 2, підрозд. 2.2.1, 2.2.2)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.2, 2.6, 2.7.2)
Виконавець НДР:		Вл.В. Подольський
Старш. дослідник, зав. від-ня проблем здоров'я жінки фертильного віку, д-р. мед. наук.	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6)
	2021.08	(розд. 1, 2, підрозд. 1.1, 1.2, 2.2.1, 2.2.1.1, 2.2.1.2, 2.2.1.3, 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.1, 2.5, 2.7.1, 2.8, 2.9, 2.10)
Виконавець НДР:		Т.Р. Уманець
Голов. наук. спів роб. відділення захворювань органів дихання та респіраторних алергозів у дітей, д-р мед. наук	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2)
	2021.08	(розд. 1, 2, пдрозд. 1.1, 1.2, 2.2.1.1, 2.2.1.4)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.2, 2.6, 2.7.2, 2.9)

Виконавець НДР:		Л.А. Лівшиць
Зав. лаб. Геноміки людини відділу Молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАМ України, д-р біол. наук, професор,	2020.12	(розд. 2, підроз. 2.1.3)
	2021.08	(розд. 1, 2, підрозд. 2.2.2)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.4.1, 2.4.2)
Виконавець НДР:		Т.М. Камінська
Директор комунального некомерційного підприємства «Київська міська дитяча клінічна інфекційна лікарня», д-р мед. наук	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2)
	2021.08	(розд. 1, 2, підрозд. 1.1, 1.2, 2.2.1.1, 2.2.1.3, 2.2.1.4)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.2, 2.6, 2.7.2, 2.9)

СПИСОК АВТОРІВ ОРГАНІЗАЦІЙ СУБВИКОНАВЦІВ

Член Асоціації педіатрів України, д-р мед. наук, професор	_____	В.Ф.Лапшин
	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2)
	2021.08	(розд. 2, підрозд. 2.2.1.4)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.2, 2.6)
Член Асоціації ГО «Всеукраїнська асоціація психосоматичного акушерства та гінекології», мол. наук. співроб.	_____	С.А. Руденко
	2020.12	(розд. 2, підрозд. 2.1.1, 2.1.2)
	2021.08	(розд. 2, підрозд. 2.2.1.3)
	2021.12	(розд. 2, підрозд. 2.3.1, 2.5)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 203 с., 127 табл., 48 рис., 126 джерел посилання.

ДІТИ, ЖІНКИ, ФАКТОРИ РИЗИКУ, КОРОНАВІРУСНА ХВОРОБА-19, ВПРОВАДЖННЯ В СИСТЕМУ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я, ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ, СТАН СИСТЕМИ ІМУНІТЕТ, ОБМІНУ ВІТАМІНУ D ТА ЗГОРТАЛЬНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ РОЗРОБЛЕНИХ ЗАХОДІВ.

Об'єкт дослідження: 525 проанкетованих жінок фертильного віку та 390 проанкетованих дітей віком від 0 до 17 років, які перенесли коронавірусну хворобу-19.

Мета дослідження: визначити ефективність розроблених методів діагностики, профілактики та лікування коронавірусного інфікування у дітей та жінок груп ризику щодо можливості коронавірусного інфікування для впровадження в систему охорони здоров'я України на підставі дослідження визначених генетичних маркерів, імунітету, обміну вітаміну D в організмі та визначити у них стан згортальної системи крові після застосування розроблених заходів.

Методи дослідження: епідеміологічні, статистичні, генетичні, імунологічні, біохімічні, клінічні.

З'ясовано, що в поширенні коронавірусного інфікування серед жінок, що мешкають в різних регіонах України мають значення медико-біологічні, соціологічні та епігенетичні фактори ризику. Найбільшу вікову групу склали молоді жінки у віці до 35 років. За соціальним станом жінки були з різних соціальних шарів населення країни, також мали різні умови праці та побуту. Частина жінок захворіла вдома, а частина – на роботі. Визначені симптоми, ознаки та стани, що відбуваються при коронавірусному інфікуванні у жінок. У значно кількості жінок були проблеми в психоемоційному стані до захворювання, які у більшості посилились після захворювання. Після перенесеного коронавірусного інфікування у жінок виявлялись порушення в стані репродуктивного здоров'я.

Встановлено, що COVID-19 реєструвався у дітей всіх вікових груп з перевагою у підлітків. Серед респондентів, які перехворіли на COVID-19 були

переважно здорові діти з повних сімей, з низьким матеріальним станом родини, які мешкали в екологічно несприятливих умовах, половина серед яких щорічно не оздоровлювались, застосовували гаджети протягом тривалого часу за добу, захворіли переважно через контакт вдома та в школі, мали особливості перебігу хвороби залежно від регіону мешкання, характеризувались переважно тривожними станами.

Розроблено та вивчено ефективність лікувально-профілактичних заходів для жінок та дітей шкільного віку, які перенесли COVID-19, які впроваджені в роботу лікувальних установ різних регіонів України. Результати досліджень показали високу ефективність розроблених лікувально-профілактичних заходів для жінок та дітей, які перенесли COVID-19 за рахунок підвищення адаптаційних можливостей організму, позитивних змін психоемоційного стану, покращення імунологічного статусу та обміну вітаміну D.

За результатами проведених досліджень опубліковано: 4 статті в провідних фахових виданнях (з них 1 - в виданнях системи Scopus, 1 – в міжнародному, 1 – в журналі НАН України та 1 – в закордонному), 2 методичні рекомендації, отримано 10 свідоцтв на авторське право на науковий твір, зроблено 11 доповідей на науково-практичних конференціях та з’їздах.

ABSTRACT

Study report: 203 pages, 127 tables, 48 figures, 126 referencs.

CHILDREN, WOMEN, RISK FACTORS, COVID-19 IMPROVEMENT OF THE HEALTH SYSTEM, GENETIC MARKERS, THE STATE OF THE IMMUNE SYSTEM, EXCHANGE VITAMIN D AND BLOOD COAGULATION SYSTEM AFTER APPLICATION OF THE DEVELOPED ACTIONS.

Object of study: 525 women of fertile age and 390 surveyed children aged 0 to 17 years who suffered from coronavirus disease COVID-19.

The purpose of the study: to determine the effectiveness of developed methods of diagnosis, prevention and treatment of coronavirus infection in children and women at risk of coronavirus infection for introduction into the health care system of Ukraine based on studies of certain genetic markers, immunity, vitamin D metabolism and their condition of the blood coagulation system after the application of the developed measures.

Research methods: epidemiological, statistical, genetic, immunological, biochemical, clinical.

It was found that medical-biological, sociological and epigenetic risk factors are important in the spread of coronavirus infection among women living in different regions of Ukraine. The largest age group consisted of young women under the age of 35. According to their social status, women were from different social strata of the country's population, and also had different working and living conditions. Some women sicken at home and some at work. Symptoms, signs and conditions that occur during coronavirus infection in women have been identified. A significant number of women had psycho-emotional problems before the disease, most of which worsened after the disease. Reproductive health problems have been reported in women after coronavirus infection.

It was found that COVID-19 was registered in children of all ages, with a predominance in adolescents. Respondents who contracted COVID-19 were mostly healthy children from complete families, low-income families living in environmentally unfavorable conditions, half of whom did not recover annually, used gadgets for a long time per day, sicken mainly through contact at home and at school, which had

peculiarities of the disease depending on the region of residence, were characterized mainly by anxiety.

The effectiveness of treatment and prevention measures for women and school-age children who have undergone COVID-19, which are implemented in the work of medical institutions in different regions of Ukraine, has been developed and studied. The results of research showed the high effectiveness of the developed treatment and prevention measures for women and children who underwent COVID-19 by increasing the body's adaptability, positive changes in psycho-emotional state, improving immune status and metabolism of vitamin D.

According to the results of the research, 4 articles were published in leading professional publications (1 of them in Scopus publications, 1 in international, 1 in the journal of the National Academy of Sciences of Ukraine and 1 in foreign), 2 methodical recommendations, 10 patent certificates for a scientific work, made 11 reports at scientific and practical conferences and congresses.

ЗМІСТ

Том І Звіт про науково-дослідну роботу «Дослідити значення медико-біологічних та соціологічних факторів в поширенні коронавірусного інфікування серед жінок та дітей в Україні» (заключний)

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів……. 13

Вступ…….. 15

1 Вибір та обґрунтування напрямку досліджень…….. 21

1.1 Аналітичний огляд праць…….. 21

1.2 Матеріал і методи дослідження…… 44

2 Результати досліджень та їх обговорення…….. 74

2.1 Результати досліджень та їх обговорення І етапу виконання проєкту в 2020 року……... 74

2.1.1 Вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у дітей……. 74

2.1.2 Вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у жінок…… 77

2.1.3 Генетичні предиктори в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням та можуть бути діагностичними критеріями прогнозу поширення і перебігу коронавірусної інфекції для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції…….. 81

2.1.4 Визначення значення стану показників базового імунітету дітей та жінок після коронавірусного інфікування……. 85

2.1.5 Дослідження обміну вітаміну D в організмі дітей та жінок, що перенесли коронавірусне інфікування……... 90

2.1.6 Визначення вмісту креатинкінази в організмі дітей та жінок, що перенесли коронавірусне інфікування……... 93

2.2 Результати досліджень та їх обговорення І етапу виконання проєкту в 2021 року……... 95

2.2.1 Аналіз статистичних даних щодо захворюваності на коронавірусну інфекцію у 2020 році та в першому кварталі 2021 року у різних областях України…….. 95
2.2.1.1 Соціально-економічна характеристика декотрих областей України з високою поширеністю SARS-Cov2 інфекції…….. 95
2.2.1.2 Оцінка можливостей системи охорони здоров'я надання допомоги щодо протидії поширенню та боротьбі із наслідками коронавірусної хвороби в регіонах України……. 96
2.2.1.3 Вивчення поширеності коронавірусного (SARS-CoV2) інфікування серед жінок репродуктивного віку……. 98
2.2.1.4 Вивчення поширеності коронавірусного (SARS-Cov2) інфікування серед дітей України…….. 99
2.2.2 Генетичні предиктори в організмі жінок і дітей з коронавірусним інфікуванням, які можуть бути діагностичними критеріями прогнозу поширення і перебігу коронавірусної інфекції для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції……. 99
2.2.3 Визначення значення стану показників імунітету жінок та дітей після коронавірусного інфікування…….. 118
2.2.4 Дослідження обміну вітаміну D в організмі жінок та дітей, що перенесли коронавірусне інфікування……... 135
2.2.5 Визначення вмісту ферментів креатинкінази та лактатдегідрогенази в сироватці крові в організмі жінок та дітей, що перенесли коронавірусне інфікування……... 139
2.2.6 Особливості стану серцево-судинної системи у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування……. 145
2.3 Результати досліджень та їх обговорення II етапу виконання проєкту в 2021 року……... 147
2.3.1 Результати клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом, показників стану репродуктивного здоров'я та визначення клініко-статистичних, медико-

біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України…… 147
2.3.2 Результати клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом та визначення клініко-статистичних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України…….. 148
2.4 Результати визначення епігенетичних предикторів в організмі жінок з коронавірусним інфікуванням, які можуть бути факторами ризику для поширення і перебігу коронавірусної інфекції……. 150
2.4.1 Оптимізований метод молекулярно-генетичного вимірювання довжени теломер…….. 150
2.4.2 Аналіз відносної середньої довжини теломер у обстежених жінок…… 152
2.5 Комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за жінками фертильного віку, які перенесли коронавірусне інфікування……... 155
2.6 Комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за дітьми шкільного віку, які перенесли коронавірусне (SASR-Cov-2) інфікування…….. 156
2.7 Вивчення ефективності розроблених лікувально-профілактичних заходів для жінок і дітей, які перенесли COVID-19 з визначенням показників імунітету, дослідженням обміну вітаміну D та показників згортальної системи крові в організмі жінок та дітей…… 157
2.7.1 Клінічна характеристика та показники стану здоров'я жінок до та після лікувальних та профілактичних заходів……..... 157
2.7.2 Клінічна характеристика та показники стану здоров'я дітей до та після лікувальних та профілактичних заходів……. 162
2.8 Визначення показників імунітету після лікувально-профілактичних заходів……... 166

2.9 Визначення показників обміну вітаміну D після лікувально-профілактичних заходів……... 170
2.10 Визначення показників згортальної системи крові після лікувально-профілактичних заходів…….. 173
Висновки…….. 179
Перелік джерел посилання…….. 192
Том II Додатки до звіту……... 204

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ACE2	- ангіоперетворюючий ензим 2
CD	- Т-лімфоцити цитоксини
CD	- кластер диференцювання
CD3	- Т-лімфоцити
COVID-19	- коронавірусна хвороба 2019
HADS	- госпітальна шкала тривоги та депресії
I/D	- ісерція/делеція
CD	- кластер диференцювання
IFNL4	- ген інтерферону λ4
Ig	- імуноглобуліни
IL-2	- ген інтерлейкіну2
IL-6	- ген інтерлейкіну 6
IL-8	- ген інтерлейкіну8
n	- кількість обстежених дітей
S	- single-copy gene copy number, кількість альбумінової ДНК у зразку
SARS-CoV-2	- коронавірус-2, який викликає важкий гострий респіраторний синдром
SD	- стандартне відхилення
T	- telomere repeat copy number, кількість теломерної ДНК у зразку
T/S	- співвідношення, що характеризує відносну середню довжину теломер
TNF	- фактор некрозу пухлин
Абс.ч	– абсолютне число
АП	– адаптаційний потенціал
АПФ-2	- ангіотензинперетворюючий фермент – 2
ACE1	– ген ангіотензинперетворюючого ензиму 1
ВШ	– відношення шансів
ГРДС	- гострий респіраторний дистрес-синдром
ГХ	– гіпертонічна хвороба
ДДЗ	- дитячий дошкільний заклад

ДСН або SDS	- додецилсульфат натрію
ЕДТА	- етилендиамінтетраамінооцтова кислота
ЕКГ	- електрокардіограма
ЖФВ	- жінки фертильного віку
ЗІС	- засоби індивідуального захисту
ІП	- індекс позитивності
КК	- креатинкеназа
КТ	- комп'ютерна томографія
ЛДГ	- лактатдегідрогеназа
ЛПЗ	- лікувально-профілактичні заходи
МЗС	- мультисистемний запальний синдром
ММКПЛР	- мутьтиплексна монохромна кількісна полімеразна ланцюгова реакція
МНЗ	- мононуклеотидна заміна
МПК	- мононуклеори периферичної крові
ОС	- оксидантного стресу
ПКС	- постковідний синдром
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
ПТСР	- посттравматичного стресового розладу
р	- вірогідність відмінностей
РАС	- ренін-ангіотензинова система
РЗ	- репродуктивне здоров'я
РІ	- розчин пропідій йодид
РІ+	- пермобілізовані мертві клітини
САМР	- синтез антимікробного пептиду
СВД	- синдром вегетативної дисфункції
СДВНС	- синдром дисфункції вегетативної нервової системи
СРБ	- С-реактивний білок
Тріс	- гідроксиметилметилен-амін
ХЗЗСО	- запальних захворювань статевих органів
ЦНС	- центральна нервова система
ШОЕ	- швидкість осідання еротроцитів

ВСТУП

Коронавірусна хвороба, що ідентифікована в Китаї наприкінці 2019 року (COVID-19) є надзвичайно актуальною проблемою для здоров'я людства.

Коронавірусна хвороба 2019 (COVID-19) – це гостре інфекційне захворювання дихальних шляхів, збудником якої являється новий коронавірус і зараз, відповідно до наказу Міжнародного комітету з таксономії вірусів має назву важкий гострий респіраторний синдром коронавірус 2 (SARS-CoV-2). Про дану хворобу стало відомо спершу 31 грудня 2019 коли ВОЗ була проінформована про випадки пневмоній невизначеної мікробної етіології в місті Ухань, провінції Хубей, Китай. Пізніше стало відомо, що у відібраних зразках пацієнтів визначено новий тип коронавірусу. За лічені тижні локальний спалах набув загрозливих обрисів і переріс в світову проблему. 30 січня 2020 року ВООЗ оголосила спалах COVID-19 масштабною надзвичайною ситуацією у галузі охорони здоров'я. 11 березня 2020 р. ВООЗ оголосила COVID-19 глобальною пандемією.

Хоча поширеність COVID-19 серед дітей нижче ніж у дорослих, але захворювання реєструється в різному віці, навіть у новонароджених і дітей до року, які розглядаються групою високого ризику.

Відомо, що клінічний перебіг в дитячому віці більш легкий, переважно асимптоматичний порівняно з дорослими, але останні данні описують гостру картину захворювання серед дитячого населення і описують це як мультисистемний запальний синдром асоційований з COVID-19 у дітей.

В теперішній час висувається багато теорій, що пояснюють більш легкий перебіг COVID-19 серед дітей (представленість та функція ангіотензін перетворюючого ензиму (ACE) 2, «тренованість» імунної системи, фізіологічний лімфоцитоз та ін.), але точних причин та захисних маркерів захворювання не визначено.

Наразі відсутні достовірні дані про зв'язок обтяжуючих коморбідних станів у дітей та ступеню важкості перебігу COVID-19. До теперішнього часу залишаються не вивченими і потребують подальших досліджень вплив медико-

біологічних, соціальних факторів на ризик інфікування та перебіг захворювання у дітей.

Дослідження генетичних чинників спадкової схильності до інфікування та чутливості різних клітин до ураження вірусом SARS-CoV-2 відкриває перспективи визначення генетичних маркерів прогнозу перебігу захворювання та фундаментальної бази для персоніфікованої терапії захворювання на COVID-19. Наразі світова наукова спільнота вже активно досліджує фактори спадкової схильності до інфікування та важкості перебігу захворювання COVID-19. Основними генами, які вивчаються, є ген рецептору входу вірусу у клітину ACE2 [1]; ген, що разом з ACE2 входить до ренін-ангіотензинової системи – ACE1; а також гени системи груп крові людини AB0; активізувалися дослідження гену IFN-λ4 типу. Вже давно відома висока інформативність поліморфізму rs12979860 в якості фармакогенетичного маркера відповіді на противірусну терапію.

З'ясування епігенетичних факторів, що виявляються у інфікованих жінок та дітей є надзвичайно актуальним, оскільки епігенетичні фактори можуть бути такими факторами ризику, які можуть сприяти інфікуванню жінок і дітей коронавірусом людини. Епігенетика - в біології, зокрема в генетиці - вивчає закономірності епігенетичного успадкування: зміни експресії генів або фенотипу клітини, викликаних механізмами, що не торкаються зміни послідовності ДНК. Назва походить від грецької (επί) над, вище, зовнішній і генетика. Прикладами епігенетичних змін є метилювання ДНК та деацетилювання гістонів – ці механізми впливають на зменшення або повну інактивацію експресії генів. Епігенетичні зміни зберігаються у ряді клітинних поділів, і навіть можуть передаватися наступним поколінням при мейозі. При цьому, вони не викликають будь-яких змін у послідовності ДНК але призводять до диференціальної експресії генів.

Початок активним дослідженням ролі метилування в регуляції генетичної експресії було покладено ще у 70-ті роки [2]. Наразі дослідження епігенетичних механізмів регулювання роботи генів поступово виходить із теоретичних до практичних застосувань у медичній практиці.

З сучасних позицій визначення прогнозу розвитку та перебігу захворювання відбувається при урахуванні сукупності медико-соціальних факторів, клініко-функціональних ознак в співставленні з асоційованими генетичними маркерами. Тому, з цих позицій, актуальним є вивчення значимих факторів ризику інфікування, особливостей клінічного перебігу, асоціацію певних поліморфних варіантів обраних генів кандидатів з характеристиками тяжкості перебігу COVID-19 у дітей. Це дозволить встановити групу ризику серед дітей, які більш схильні до інфікування та тяжкого перебігу COVID-19.

Загальною метою дослідження було: на підставі дослідження загального стану здоров'я дітей та жінок, репродуктивного здоров'я у жінок та факторів ризику, проведення генетичних, імунологічних та біохімічних досліджень визначити нові діагностичні критерії для поширення і перебігу коронавірусної інфекції, розробити методи профілактики і лікування за для покращення безпеки людей і суспільства.

Загальними завданнями дослідження було:

1. Провести клініко-статистичні та соціологічні дослідження, щодо особливостей стану здоров'я дітей і жінок, що зазнали інфікування коронавірусом.

2. З'ясувати, які генетичні предиктори виявляються в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням та можуть бути діагностичними критеріями для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції.

3. Дослідити значення епігенетичних факторів в поширенні коронавірусної інфекції серед дітей та жінок.

4. Вивчити роль медико-біологічних факторів, як факторів ризику перебігу коронавірусного інфікування та їх врахування для виділення дітей і жінок в групи ризику.

5. Визначити патогенетичне значення стану показників базового імунітету дітей та жінок груп ризику до та після інфікування.

6. Дослідити обмін вітаміну D в організмі дітей та жінок та з'ясувати патогенетичну роль цього вітаміну в сприянні проникненню вірусу в організм та вплив його обміну в організмі на можливість вірусного інфікування.

7. З’ясувати стан показників згортальної системи крові в організмі дітей та жінок до та після інфікування коронавірусом людини.

Запланована науково-дослідна робота передбачалась для виконання в два етапи. Перший етап виконання в 2020 році та другий етап виконання в 2021 році.

Метою дослідження І етапу виконання проєкту в 2020 році було: на підставі дослідження загального стану здоров’я дітей та жінок, репродуктивного здоров’я у жінок та факторів ризику, проведення генетичних, імунологічних та біохімічних досліджень визначити нові діагностичні критерії для поширення і перебігу коронавірусної інфекції та покращити безпеку людей і суспільства.

Завданнями роботи І етапу виконання проєкту в 2020 року було:

1. Провести клініко-статистичні та соціологічні дослідження, щодо особливостей стану здоров’я дітей і жінок, що зазнали інфікування коронавірусом;

2. Вивчити роль медико-біологічних факторів, як факторів ризику перебігу коронавірусного інфікування та їх врахування для виділення дітей і жінок в групи ризику;

3. З’ясувати, які генетичні предиктори виявляються в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням та можуть бути діагностичними критеріями для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції;

4. Визначити патогенетичне значення стану показників базового імунітету дітей та жінок груп ризику до та після інфікування;

5. Дослідити обмін вітаміну D в організмі дітей та жінок та з’ясувати патогенетичну роль цього вітаміну в сприянні проникненню вірусу в організм та вплив його обміну в організмі на можливість вірусного інфікування;

6. З’ясувати стан показників згортальної системи крові в організмі дітей та жінок до та після інфікування коронавірусом людини.

Другий етап виконання роботи в 2021 році був розподілений, в свою чергу, на два етапи.

Метою дослідження І етапу виконання проєкту в 2021 році було: на підставі дослідження загального стану здоров'я дітей та жінок, репродуктивного здоров'я у жінок та факторів ризику, проведення генетичних, імунологічних та біохімічних

досліджень визначити нові діагностичні критерії для поширення і перебігу коронавірусної інфекції, розробити методи профілактики і лікування за для покращення безпеки людей і суспільства.

Завдання роботи I етапу виконання проєкту в 2021 року було:

1. Провести клініко-статистичні та соціологічні дослідження, щодо особливостей стану здоров'я дітей і жінок, що зазнали інфікування коронавірусом.

2. З'ясувати, які генетичні предиктори виявляються в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням та можуть бути діагностичними критеріями для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції.

3. Визначити патогенетичне значення стану показників базового імунітету дітей та жінок груп ризику до та після інфікування.

4. Дослідити обмін вітаміну D в організмі дітей та жінок та з'ясувати патогенетичну роль цього вітаміну в сприянні проникненню вірусу в організм та вплив його обміну в організмі на можливість вірусного інфікування.

5. З'ясувати стан показників згортальної системи крові в організмі дітей та жінок до та після інфікування коронавірусом людини.

6. З'ясувати ефективність визначених генетичних предикторів, які виявляються в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням, як діагностичні критерії для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції.

Метою дослідження II етапу виконання проєкту в 2021 році було: визначити ефективність розроблених методів діагностики, профілактики та лікування коронавірусного інфікування у дітей та жінок груп ризику щодо можливості коронавірусного інфікування для впровадження в систему охорони здоров’я України на підставі дослідження визначених генетичних маркерів, стану імунітету, обміну вітаміну D в організмі та визначити у них стан згортальної системи крові після застосування розроблених заходів.

Завдання роботи на II етапі виконання проєкту в 2021 році було:

1. Проаналізувати результати клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров’я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом,

показників стану репродуктивного здоров’я та визначення клініко-статистичних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування, за даними проведеного анкетування в різних регіонах України.

2. Проаналізувати результати статистичного та математичного обрахування клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров’я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом, показників клінічних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування, за даними проведеного анкетування в різних регіонах України.

3. Дослідити значення епігенетичних факторів в поширенні коронавірусної інфекції серед жінок та дітей, що зазнали інфікування коронавірусом.

4. Розробити ефективні методи діагностики, профілактики та лікування коронавірусного інфікування у жінок та дітей груп ризику щодо можливості коронавірусного інфікування для впровадження в систему охорони здоров’я України.

5. Визначити ефективність розроблених методів діагностики, профілактики та лікування коронавірусного інфікування у жінок та дітей груп ризику щодо можливості коронавірусного інфікування на підставі дослідження визначених стану імунітету, обміну вітаміну D в організмі та визначити у них стан згортальної системи крові після застосування розроблених заходів.

Науково-дослідна робота «Дослідити значення медико-біологічних та соціологічних факторів в поширенні коронавірусного інфікування серед жінок та дітей в Україні» визначена в результаті конкурсного відбору серед наукових проектів “Наука для безпеки людини та суспільства”, що рекомендуються до реалізації за рахунок грантової підтримки Національного фонду досліджень України.

1 ВИБІР НАПРЯМКУ ТА ОБГРУНТУВАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1 Аналітичний огляд праць

SAR-CoV2 або COVID-19 - це інфекційне захворювання, яке швидко перетворилося в глобальну пандемію, яка має суттєві соціальні і економічні наслідки у всьому світі.

В даний час світ переживає третю хвилю коронавірусної інфекції SARS-CoV-2. Захворювання, яке спричиняє даний вірус, було визначено офіційною назвою COVID-19 ВООЗ 11 лютого 2020 року з летальністю ~2 % -3 % [3].

Діти складають 9-12 % пацієнтів з діагнозом COVID-19 [4]. В цілому, 90,0 % дітей з позитивним результатом на SARS-CoV-2 є «безсимптомними», або мають легкі та помірні симптоми. Кілька запропонованих гіпотез пояснюють перевагу більш легкого перебігу COVID-19 у дітей порівняно з дорослими. Перша гіпотеза припускає, що рівень експресії ACE2 може відрізнятися у дорослих і дітей. Рецептори ACE2 активно експресуються на добре диференційованих клітинах війкового епітелію дихальних шляхів [1]. Експресія ACE2 на епітелії альвеолярних клітин може бути нижче в педіатричній популяції. Друга гіпотеза припускає, що діти мають якісно іншу імунологічну відповідь на вірус SARS-CoV-2 в порівнянні з дорослими. В процесі зростання дитини безперервна стимуляція антигенами і інволюція тимусу призводить до збільшення від наївних Т-клітин до Т-клітин пам'яті, ефекторних Т-клітин та Т-клітин пам'яті [5]. Третя гіпотеза ґрунтується на конкуренції вірусів, а саме одночасна інфікованість дихальних шляхів іншими респіраторними вірусами змушує SARS-CoV-2 конкурувати з ними, обмежуючи його реплікацію та поширення [5].

Поширеність COVID-19 у дітей з часом змінювалась. Так, Китайські центри з контролю і профілактики захворювань повідомляли, що тільки 2 % з 72 314 зареєстрованих випадків реєструвались в дітей у віці до 19 років [6]. Пізніше дані США показали, що діти складають від 9 % до 12 % пацієнтів. Вже до середини

листопада 2020 року кількість випадків COVID-19 у дітей перевищила позначку в 1 мільйон [7].

Серед країн з найвищою поширеністю COVID-19 у дітей визначено: США - 2,0 % [8]; Китай - 2,2 % [9]; Італія - 1,2 % [9] і Іспанія - 0,8 % [11].

COVID-19 частіше зустрічається у дітей вікової групи від 12 до 17 років в порівнянні з віковою групою від 5 до 11 років [12]. Немовлята складають 0,3 % всіх дітей з COVID-19 [13].

Порівняно з дорослими, менше дітей з COVID-19 потребують госпіталізації (від 6 % до 20 %), і лише 0,6 % - 2 % у відділення інтенсивної терапії та реанімації. Госпіталізація поширена серед дітей у віці до 1 року і дітей з супутніми захворюваннями, такими як серцево-судинні захворювання, хронічні захворювання легень, бронхіальна астма та захворювання, що супроводжуються імуносупресією [8].

За даними CDC рівень госпіталізації, який пов'язаний з COVID-19, серед дітей склав 8,0 на 100 000 населення і мав перевагу у віковій групі дітей до 2 років (24,8 на 100 000 осіб), які належали до іспаномовних/ латиноамериканських або афро-американських етнічних груп (16,4 і 10,5 на 100 000 осіб відповідно). На відміну від вказаних етнічних груп рівень госпіталізації «білих» дітей склав 2,1 на 100 000 осіб. Серед госпіталізованих дітей 33,2% були госпіталізовані в відділення інтенсивної терапії, а 5,8 % потребували штучної вентиляції легень. У даному дослідженні повідомлялося лише про 1 летальний випадок [4].

Відомо, що у дітей з SARS-CoV-2 інфекцією асоційований мультисистемний запальний синдром (МЗС), який розвивається через 2-3 тижні після піку інфекційного процесу. За даними CDC було зареєстровано 570 випадків, які відповідали визначенню МЗС. Клінічний перебіг у цих дітей характеризувався переважно шоком, серцевої дисфункцією, болем у животі, помітно підвищеними запальними маркерами і позитивним тестом SARS-CoV-2. Більшість дітей (63,9 %) потребували лікування в відділенні інтенсивної терапії, а 1,8 % померли [14].

Спосіб передачі SARS-CoV-2 у дітей аналогічний такому як у дорослих. Передача між людьми відбувається повітряно-крапельним шляхом. Тісний контакт

також може бути джерелом передачі SARS-CoV-2 через прямий або непрямий контакт зі слизовими оболонками очей, рота або носа. Вважається, що більшість дітей інфікуються від дорослих [15]. В даний час немає ніяких доказів вертикальної передачі від матері до дитини [16]. Хоча діти можуть передавати SARS-CoV-2 вірус іншим особам, однак діти молодшого віку мають низьку ймовірність трансмісії ніж діти старше 10 років [17].

Клінічній перебіг коронавірусної хвороби-19 у дітей характеризується від безсимптомних до критичних форм. Так, за даними A. Adebayo (2021) безсимптомні форми реєструвались у 4,0 % дітей, легкі (лихоманка, кашель, міалгія, втома)– у 51,0 % дітей, середньо-тяжкі (ознаки пневмонії або субклінічний перебіг з аномальною візуалізацією легень) – у 39,0 %, тяжкі (задуха, гіпоксія, центральний цианоз) – у 5,0 % та критичні (гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС), шок, поліорганна дисфункція) – у 0,6 % хворих [18].

У дітей менше ускладнень (шок і гострий респіраторний дистрес-синдром) у порівнянні з дорослими. Існуючі дані свідчать, що немовлята та діти до року можуть мати високий ризик важкого або критичного перебігу захворювання в порівнянні з дітьми старшого віку [19]. Вагітні жінки і новонароджені, інфіковані SARS-CoV-2, мали підвищений ризик розвитку важкої пневмонії [20].

Найбільш поширені лабораторні зміни серед госпіталізованих дітей з COVID-19 включають лейкопенію або лейкоцитоз, лімфопенію, підвищений рівень аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лактатдегідрогенази. Запальні маркери, такі як СРБ, ШОЕ, прокальцитонін, D-димер і рівні феритину, також можуть бути підвищені, особливо при МЗС [21.22]. Наявність підвищеного тропоніну у пацієнтів з COVID-19 пов'язано з міокардитом і може бути маркером поганого прогнозу [23].

Рентгенологічні зміни у дітей з COVID-19 аналогічні дорослим пацієнтам і характеризуються односторонніми або двосторонніми інфільтратами, змінами по типу «матового скла» [24]. Сонограма, комп'ютерна томографія грудної клітини у хворих дітей на COVID-19 виявляють неспецифічні зміни схожі як у дорослих пацієнтів [25]. Деякі пацієнти мають двосторонні многодолькові і субсегментарні

ателектази, а кількість залучених сегментів легень корелює з тяжкістю захворювання. Інфільтрати мають тенденцію зливатися по мірі прогресування захворювання. Трансторакальне ультразвукове дослідження легенів зазвичай використовується для виявлення набряку легенів у пацієнтів з ГРДС з чутливістю і специфічністю від 0,78 до 0,9 [26.27].

Відомо, що після гострих симптомів COVID-19 частина пацієнтів, як дорослих так і дітей, розвивають так званий постковідний синдром. Синдром «тривалого COVID» або «пост-COVID-19» отримав широке визнання серед наукової та медичної спільноти. До цього часу цей стан ще недостатньо вивчений, оскільки реєструється незалежно від тяжкості перенесеної коронавірусної хвороби. В огляді Shin Jie Yong (2021) зазначено, що найбільш поширеними симптомами, про які повідомляється у багатьох дослідженнях, є втома та задишка, що тривають місяцями після гострого COVID-19 [28]. Інші персистуючі симптоми включають когнітивні та психічні порушення, болі в грудях та суглобах, серцебиття, міалгію, порушення запаху та смаку, кашель, головний біль, шлунково -кишкові та серцеві проблеми. Патогенетичні механізми цих порушень можуть бути обумовлені тривалим пошкодженням тканин (наприклад, легенів, мозку та серця) та запаленням (наприклад, через персистенцію вірусу, порушення імунної регуляції та автоімунні механізми). Фактори ризику вважають жіночу стать, більш ніж п’ять ранніх симптомів COVID-19, ранню задишку, попередні психічні розлади та специфічні біомаркери (D-димер, СРБ та кількість лімфоцитів), хоча для обґрунтування таких факторів ризику потрібні додаткові дослідження.

У дітей, окрім МЗС, повідомляється також випадки міопії [29], Guillan barre синдром [30], міокардит [31], неврологічні захворювання [32,33].

Лікувально-профілактичні заходи у хворих, що перенесли COVID-19. COVID-19-це мультисистемне захворювання, яке вимагає реабілітації за участю міждисциплінарної групи для відновлення хворих [34].

Згідно «The Stanford Hall consensus» (2020) реабілітація пацієнтів із COVID-19 повинна бути спрямована на полегшення симптомів задишки, психологічного дистресу та покращення фізичної активності та якості життя [35]. Так, рекомендації

даного консенсусного документу щодо реабілітації постковідних хворих передбачають наступне:

- у пацієнтів після COVID-19 слід враховувати респіраторні ускладнення, оскільки вони можуть мати певний ступінь порушення та функціональні обмеження, включаючи, але не виключно, через зниження легеневої функції;
- рекомендується первинна оцінка легеневої функції коли це безпечно і залежно від ступеня порушення функції, нормокапнічної дихальної недостатності та фізичного, психічного стану пацієнта;
- спочатку слід розглянути можливість вправ з низькою інтенсивністю, особливо для пацієнтів, яким потрібна киснева терапія, одночасно контролюючи показники життєдіяльності (частоту серцевих скорочень, пульсоксиметрію та артеріальний тиск). Поступове збільшення фізичних вправ повинно базуватися на їх симптомах;
- вплив захворювання на стан серцево-судинної системи слід враховувати у всіх пацієнтів після COVID-19, незалежно від тяжкості, і всі пацієнти повинні мати оцінку серцевих симптомів, функції та потенційних порушень. Залежно від первинної оцінки та симптомів пацієнта, слід звернутися за консультацією до фахівця, а подальші дослідження можуть включати специфічні лабораторні маркери, ЕКГ, ехокардіограму, навантажувальні тести та/або МРТ серця;
- якщо пацієнт має серцево-судинну патологію, слід рекомендувати спеціальні програми реабілітації, які розроблені відповідно до індивідуальних особливостей пацієнта на основі їх серцевих ускладнень, порушень та оцінки потреб у реабілітації;
- пацієнтам, які після підтвердженого міокардиту повертаються до спорту високого рівня або вимагають фізичної роботи, потрібен період повноцінного відпочинку 3-6 місяців. Період спокою залежить від клінічної тяжкості та тривалості захворювання, функції лівого шлуночка на початку та ступеня запалення за даними МРТ серця;
- фізичні тренування можуть відновитися після перенесеного міокардиту, якщо систолічна функція лівого шлуночка нормальна, біомаркери пошкодження

міокарда в сироватці крові нормальні та при відсутності аритмії під час цілодобового моніторингу ЕКГ та навантажувального тесту;

- після перенесеного міокардиту або якщо праця пацієнта вимагає фізичної роботи, рекомендовано періодичне обстеження протягом перших 2 років;
- пацієнтів з COVID-19, які потребували кисневої терапії або з наявністю лімфопенії, слід обстежити на наявність рентгенологічних змін у легенях та порушень легеневої функції;
- пацієнти з COVID-19, які відчувають такі симптоми як сильний біль у горлі, болі в тілі, задишка, загальна втома, біль у грудях, кашель або гарячка, повинні уникати фізичних навантажень протягом 2 тижнів до 3 тижнів після припинення цих симптомів.
- після перенесеного COVID-19 легкого та середнього ступеня важкості перед поверненням до фізичних навантажень протягом 1 тижня слід починати з вправ низької інтенсивності на розтягування м'язів;
- усі пацієнти, які потребують реабілітації після COVID-19, повинні пройти функціональну оцінку для визначення порушень опорно-рухового апарату;
- пацієнтам із синдромом постінтенсивної терапії слід включити реабілітаційні заходи, спрямовані на відновлення психологічного, фізичного та когнітивного стану;
- пацієнтів слід оглянути на етапі одужання, щоб виявити тих, хто може мати несприятливі психологічні наслідки внаслідок перенесеного COVID-19;
- необхідно проводити активний моніторинг (постійний огляд) за особами з підпороговими психологічними симптомами;
- скерувати до психолога та розглянути когнітивно -поведінкову терапію для тих, у кого симптоми гострого стресового розладу середнього ступеню важкості;
- усі пацієнти з COVID-19 повинні бути обстежені на наявність будь-яких неврологічних симптомів, оскільки симптоми можуть бути негайними (під час активної інфекції) або відстроченими (через тижні після COVID-19);

- слід запевнити пацієнтів, що легкі неврологічні симптоми, такі як головний біль, запаморочення, втрата нюху або смаку та сенсорні зміни, ймовірно, покращяться при мінімальному втручанні та, повністю зникнуть;

- пацієнтам із помірними та важкими неврологічними симптомами для максимального одужання рекомендується спеціалізована мультипрофільна реабілітація;

- фізична, когнітивна та функціональна оцінка слід розглядатися як підтримку повернення до роботи відповідно до професійних вимог.

Щодо дітей, Американська Академія Педіатрії рекомендує, що пацієнти з середньо-важким та важким перебігом COVID-19 не повинні займатися спортом до тих пір, поки не будуть оглянуті кардіологом. Крім того, під час тренувань та спортивних заходів, за винятком плавання, боротьби, гімнастики рекомендовано носити маски [36]. Підтримується позиція щоб учні фізично були присутні в школі, а адміністратори вживали всіх заходів для зниження ризику поширення COVID-19 через фізичне дистанціювання, носіння масок і ретельну дезінфекцію [37].

Пандемія COVID-19 змусила багатьох медичних працівників змінити свою модель обслуговування, запровадивши телемедицину та телереабілітацію. В дослідженні Ізраїльських вчених було оцінено: використання реабілітаційних програм в інтернеті, що надаються молодим людям, які проходять амбулаторні сеанси фізичної терапії, трудової терапії, мовної терапії та психологічної підтримки, а також переваги та недоліки збереження цієї моделі онлайн-лікування після COVID-19 [38]. Онлайн -програму реабілітаційного лікування було надано 147 молодим людям у віці від 3 місяців до 20 років (у середньому 8,5 років). За п'ятимісячний період було проведено 2392 сеанси терапії, залучено 61 терапевта з чотирьох дисциплін, а 56,4 % молодих людей отримали два або більше видів он-лайн терапії. Більшість пацієнтів та їх батьків, медичні працівники вважали послуги телереабілітації корисними та ефективними. Результати дослідження свідчили, що гібридний підхід, при якому сеанси особистої терапії координуються з синхронними онлайн-сесіями, забезпечили високу ефективність реабілітації у пацієнтів з хронічними захворюваннями.

В огляді Shin Jie Yong (2021) на основі існуючих даних узагальнено фармакологічні та нефармакологічні підходи до лікування станів, які асоційовано з постковідним синдромом (табл. 1.1) [39].

Таблиця 1.1 - Стани подібні до «тривалого COVID» та їх лікування, за даними огляду Shin Jie Yong

Стани	Характеристика стану	Лікування
1	2	3
Тривалий або пост- COVID синдром	Тривалість ≥ 3 місяців після початку симптомів COVID-19. Втома та задишка, які можуть супроводжуватися неврологічними, нервово-психічними, серцевими або шлунково -кишковими ускладненнями.	Парацетамол та НПЗС (для полегшення специфічних симптомів) Ivabradine (тахікардія, серцебиття) Індивідуальна реабілітація
Міалгічний енцефаломієліт або синдром хронічної втоми	тривалість ≥ 6 місяців після можливих тригерів, таких як стрес або вірусна інфекція. Критерії CDC 1994 року: Втома та щонайменше з чотирьох симптомів: головний біль, міалгії, болі у суглобах, постнавантажувальна слабкість, болючість лімфатичних вузлів, порушення сну або когнітивні порушення.	Rintatolimod (TLR3 агоніст) Вакцина Staphypan Berna Coenzyme Q10 + NADH (мітохондріальний модулятор) антідепресанти анальгетики антивірусні препарати

Продовження табл. 1.1

1	2	3
	Критерії Інституту медицини (2015 року): втома, постнавантажувальна слабкість та порушення сну, які можуть супроводжуватися когнітивними порушеннями або ортостатичною непереносимістю.	когнітивно-поведінкова терапія; ступінчаста ЛФК (дискутується у літературі)
Синдром постуральної оратостатичної тихікардії	тривалість ≥ 6 місяців після можливих тригерів, таких як вірусна інфекція, операція, вагітність або струс мозку. Збільшення частоти серцевих скорочень> 30 ударів/хвилину протягом 5-10 хвилин стояння або вертикального нахилу за відсутності ортостатичної гіпотензії, а також може виникнути із запамороченням, серцебиттям, втомою, загальною слабкістю, помутнінням зору або непереносимістю фізичних вправ.	Midodrine (α1-адренергічний агоніст) Fludocortisone (кортикостероїд) Pyridostigmine (холінергічний агоніст) Propranolol (β-блокатор) Ivabradine (блокатор іонних каналів) Компресійний одяг ↑ споживання рідини та солі ЛФК Сон з піднятим узголів'ям ліжка

Продовження табл. 1.1

1	2	3
Синдром активації опасистих клітин	Підвищення рівня загальної триптази сироватки крові (або інших відповідних біомаркерів) Рецивидні або персистуючі симптоми Поліорганні симптоми шкіри (кропив'янка, ангіоневротичний набряк або почервоніння), шлунково-кишкові (діарея, нудота, блювота або спазми в животі), дихальні (хрипи), серцево-судинні (гіпотензивна непритомність, близька до непритомності або тахікардія) або ринокон'юнктивальні (ін'єкція кон'юнктиви, свербіж або закладеність носа), нервово - психічні (головний біль, тривога, безсоння або когнітивні порушення), опорно -рухові (біль у м'язах або суглобах) або конституційні (втома, астенія або гарячка).	H1 та H2 антигістамінні препарати Cromolyn (стабілізатор опасистих клітин) Антагоністи лейкотриєнів

В Кокрановському системному огляді [40] зазначено про обмежені докази ефективності різних заходів, включаючи застосування інтраназальних кортикостероїдів, щодо запобігання стійкій нюховій дисфункції після

перенесеного COVID -19. Однак, в теперішній час тривають поточні досліджень у цій галузі і докази будуть регулярно оновлюватися.

В огляді Genoveva Uzunova та свівавт. (2021) підсумували фармакологічні та нефармакологічні методи лікування тривоги при COVID-19 [41] та надали рекомендації щодо діагностики, лікування, профілактики та контролю, ключовими моментами яких є наступні: пацієнти з COVID-19 (симптоматичні, або безсимптомні) мають високу частоту нервово-психічних ускладнень, найбільший відсоток пов'язаний з тривогою; у хворих на COVID-19 існує безліч біологічних та психосоціальних факторів ризику тривоги; до біологічних факторів ризику належать стрес, стійкість, генетичні фактори, стать, вік, імунна система, пряме інфікування центральної нервової системи SARS-CoV-2, супутні психіатричні та загальні медичні захворювання, перебування у відділенні реанімації та інтенсивній терапії; аносмія та гіпогевзія є специфічними факторами ризику тривоги щодо COVID-19; існує зворотна кореляція між стійкістю та тривогою через COVID-19, тому слід докласти зусиль для підвищення стійкості у пацієнтів із COVID-19; при COVID-19 важливим механізмом тривоги є нейрозапалення, що виникає в результаті активації імунної системи та цитокінової бурі; загальний підхід до боротьби з тривогою при COVID-19 має бути подібним до того, що відбувається під час травми чи катастрофи, із зосередженням зусиль на вихованні почуття надії та стійкості; вибираючи фармакологічне лікування тривоги, реакція на стрес та вплив імунної системи мають бути ключовими; слід уникати прийому ліків із серцево-респіраторними побічними ефектами у пацієнтів з проблемами дихання; потрібно тривале спостереження щонайменше місяць після COVID-19.

В дослідженні Alpcan, A та співавт. (2021) доведено, що діти з COVID-19 мають нижче рівні 25 (OH)D3 ніж з контрольної групи, а також встановлений кореляційний зв'язок даного показника з тяжкістю захворювання [42]. У подібному дослідженні Yilmaz and Şen [43] довели кореляцію між рівнем вітаміну D та COVID-19 у дітей та показали, що рівень вітаміну D був значно нижчим у пацієнтів з COVID-19, ніж у контролі. Крім того, лихоманка частіше спостерігалась в групі дітей з дефіцитом вітаміну D.D. Akoğlu et al. [44] також виявили, що рівень 25 (OH)

D3 був значно нижчим у групі середньої тяжкості, ніж у групі легкої форми захворювання. Деякі дослідження виявили негативну кореляцію між рівнем вітаміну D та рівнем СРБ та підвищенням прозапальних цитокінів, таких як IL-6 [45,46]. Вітамін D модулює вивільнення запальних цитокінів та хемокінів [46,47].

В дослідженні A. Rustecka та співавт. (2021) встановлено, що обмеження під час пандемії COVID-19 та проведення значного часу вдома призвели до зниження вітаміну D у дітей старше року. Характерна сезонна мінливість рівнів вітаміну D у сироватці крові дітей до пандемії не спостерігалась в період пандемії [48].

Всі ці дослідження обґрунтовують профілактичне призначення та можливу користь від саплементації вітаміну Д для підтримки циркулюючого 25 (OH)D3 на оптимальному рівні (75–125 нмоль/л) під час цієї пандемії COVID-19 [42]. Механізми, що пояснюють роль вітаміну Д в профілактиці COVID-19, пов'язані з індукцією експресії ACE2 [49].

З'ясування епігенетичних факторів, що виявляються у інфікованих жінок та дітей є надзвичайно актуальним, оскільки епігенетичні фактори можуть бути такими факторами ризику, які можуть сприяти інфікуванню жінок і дітей коронавірусом людини. Епігенетику можна визначити як процес взаємодії генотипу організму з середовищем при формуванні фенотипу. Вона вивчає механізми, за допомогою яких, на основі генетичної інформації, що міститься в одній клітині (зіготі), за рахунок різної експресії генів в різних типах клітин, може здійснюватися розвиток багатоклітинного організму, що складається з диференційованих клітин [50]. Під час морфогенезу тотипотентні стволові клітини формують різні плюрипотентні клітинні лінії ембріона, які в свою чергу дають початок повністю диференційованим клітинам. Іншими словами, одна запліднена яйцеклітина - зигота - диференціюється в різні типи клітин, включаючи: нейрони, м'язові клітини, епітелій, ендотелій судин та інші, шляхом множинних поділів. Це досягається активацією одних генів, і в той же час інгібуванням інших за допомогою епігенетичних механізмів [51].

Найбільш вивченим, наразі, епігенетичним механізмом є метилювання цитозинових основ ДНК. Функція метилювання полягає в активації/інактивації

гена. У більшості випадків метилювання призводить до пригнічення активності гена, особливо при метилюванні його промоторних ділянок, а деметилювання – до його активації. Показано, що навіть незначні зміни у ступені метилювання ДНК можуть суттєво змінювати рівень генетичної експресії [52,53].

Епігенетичні фактори впливають на активність експресії певних генів на кількох рівнях. Одним із механізмів такого впливу є ремодуляція хроматину. Від густоти розташування гістонів в ділянках геному, що активно експресуються, залежить інтенсивність експресії генів. Ремоделювання хроматину — це процес активної зміни «густоти» нуклеосом та спорідненості гістонів із ДНК. Це процес переміщення нуклеосом по ДНК, що призводить до зміни щільності нуклеосом, або розташування їх на певній відстані одна від одної. Ремоделювання здійснюється спеціальними білковими комплексами, із витратою енергії молекул АТФ.

Ремоделювання – ключовий процес в ініціації транскрипції, реплікації, зв'язуванні транскрипційних факторів, підтримці статусу хроматину (активний/неактивний) і як результат – призводить до активації транскрипції генів при утворенні відкритого хроматину.

Не тільки компактність розташування ДНК в клітині впливає на активність наявних в ній генів, але й специфічна конфігурація молекули на кінцях хромосом. ДНК на кінцях хромосом має вигляд великої кількості повторів однієї послідовності (TTAGGG)n, зазвичай від 5 до 15 кб у довжину в соматичних клітинах [54]. Ці повтори в комплексі з протеїнами називаються теломерами. Теломери є високо-консервативними послідовностями, що не схильні до деградації, рекомбінації, або злиття з кінцями інших хромосом, більше того на них не реагують системи репарації ДНК [55].

Сукупність цих властивостей забезпечує виконання теломерами захисної функції хромосом. Вищезгадана функція у людини забезпечується формуванням Т-петель, що утворюються при поєднанні багатого на гуанідин 3’-оверхенгу (35-600 нуклеотидів у довжину) із дволанцюговою частиною теломери [56]. Стабілізується така структура нуклеїновими та нуклеотидними взаємодіями, а 3’-оверхенги

утворюються завдяки одночасно кінцевій недореплікації та посттранскрипційній модифікації [57].

Кінцева недореплікація разом з рядом інших факторів відповідальна за вкорочення теломер з кожним поділом клітини. Відповідно, якщо ці хромосомні структури відіграють важливу роль у процесі клітинного старіння, то їхнє скорочення із віком є важливим маркером для визначення старіння організму [58,59].

Таким чином довжина теломер є досить розповсюдженим біомаркером старіння та пов'язаних із ним патологічних станів, адже відповідає одразу декільком вимогам: вона корелює з біологічним віком, варіюється між індивідами, пов'язана з базовою біологією людини [60,61,62]. На сьогоднішній день у кросс-секційних або лонгітюдних дослідженнях використовується вимірювання довжини теломер лейкоцитів периферичної крові, за умови, що когорти пацієнтів, які порівнюються з контролем, відповідають цьому контролю за віком і статтю. Хоча зв'язок теломер і клітинного старіння, а також вкорочення теломер внаслідок оксидативного стресу, вже доведені, картина в клінічних і епідеміологічних результатах все ще залишається неоднозначною [63,64,65]. Тим не менш, довжина теломер наразі залишається одним із найбільш широко використовуваних біомаркерів старіння в епідеміологічних та клінічних дослідженнях. В останні роки довжина теломер також все частіше використовується як потенційний біомаркер в персоналізованій медицині [66].

Для розуміння основних принципів біології теломер слід зазначити, що **т**еломери є життєво необхідними структурами, що захищають кінці хромосом від дії ендонуклеаз, злипання, а також від механізмів репарації пошкодженої ДНК. Повторювані, консервативні послідовності TTAGGG вкриті захисними білками – шелтеринами. Ці білки, разом із протеїнами, задіяними у ремоделюванні хроматину, структурують теломери та захищають кінці хромосом. При кожному поділі соматичної клітини довжина теломер вкорочується на 50-200 пар нуклеотидів [67]. Це явище зумовлене специфікою ДНК полімерази, яка не може повністю синтезувати кінець 3'-ланцюгу ДНК, а також, основним чином,

оксидативним стресом, оскільки лише 10 із 50-200 нуклеотидів залишаються несинтезованими через кінцеву недореплікацію, а більшість теломер вкорочується через пошкодження, індуковані оксидативним стресом [68]. У нормальних умовах клітини, після певної кількості поділів, досягають ліміту Хейфліка, після якого вони не можуть проліферувати і досягають стану реплікативного старіння [69]. Теломери ж, ушкоджені активними формами кисню, можуть індукувати під впливом оксидативного стресу передчасне старіння клітини, що характеризується змінами в морфології, зупинкою поділу, а також збільшенням активності сенільної бета-галактозидази [70].

Оксидативний стрес в клітині виникає внаслідок появи надлишку активних форм кисню. Ці молекули є сильними окисниками, що реагують з ліпідами, протеїнами та нуклеїновими кислотами, спричиняючи їх пошкодження та мутації. ДНК серед біомолекул є однією з найсприйнятливіших до дії активних форм кисню, що можуть викликати модифікації основ, окиснення цукру, або розриви в ланцюзі [71]. Серед великої кількості маркерів оксидативного стресу в клітині лише декілька можна використовувати для оцінки пошкодження геному, головний серед них – це 8-оксогуанін, що є високомутагенним завдяки механізму його репарації, за якої відбувається трансверсія. Захист клітини від реактивних форм кисню передбачає і дію антиоксидантів, і механізмів репарації ДНК [72,73]. Відсутність ефективної системи репарації пов’язують, зокрема, з підвищеним ризиком розвитку онкозахворювань [74]. Аналогічно, 8-оксогуанін є джерелом пошкоджень ланцюгів ДНК [75].

Для теломер активні форми кисню є особливо небезпечними з двох причин: по-перше, через високий вміст гуаніну вони накопичують в собі 8-оксогуанін, а по-друге, через просторову організацію хроматину теломерні ділянки майже не підлягають впливу механізмів репарації ДНК. Це було досліджено Пітерсоном зі співавторами у досліді, суть якого полягала в індукуванні оксидативного стресу у фібробластах людини та визначенні кількості одноланцюгових розривів [76]. Результатом досліду було те, що розриви накопичувалися як у мінісателітах, так і в теломерах, але через день розриви в мінісателітах були повністю репаровані, тоді

як у теломерах репарація була значно повільнішою. Швидше за все поясненням такого неповноцінного відновлення є саме просторова організація теломерної ДНК, прикріплення якої до протеїну TRF2 (Telomeric repeat-binding factor 2) суттєво ускладнює репарацію, в порівнянні з рештою геномною ДНК. Додатковими двома можливими шляхами інгібування репарації ДНК є фосфорилювання TRF2 ATM-кінази і взаємодія TRF2 з бета-полімеразою [77,78]. Ці фактори разом є причиною накопичення в теломерах пошкоджень, що призводять до прискорених темпів їх вкорочення [79].

Хоча точні механізми вкорочення теломер внаслідок впливу оксидативного стресу залишаються до кінця не з'ясованими, але численні дослідження демонструють, що саме теломери акумулюють більшість пошкоджень геному [80,81]. Окрім того, було встановлено зв'язок між викликаним активними формами кисню оксидативним стресом та пришвидшеним вкороченням теломер у фібробластах людини in vitro у клітинах пацієнтів із мутаціями мітохондріальної ДНК, що характеризувалися збільшеною кількістю активних форм кисню в клітині [82,83].

Для визначення ролі епігенетичних факторів важливим є розуміння генетичних детермінантів теломер та факторів середовища. Довжина теломер, швидкість їхньої ерозії та вкорочення з віком залежать в однаковій мірі як від генетичних факторів, так і від умов навколишнього середовища. Двома потенційними джерелами успадкування довжини теломер є варіації в нетеломерних регіонах (наприклад, однонуклеотидні мутації, що впливають на підтримку теломер), а також варіативність довжини теломер батьківських статевих клітин, які безпосередньо утворюють зиготу (так зване «пряме спадкування»).

Існують вагомі докази того, що довжини теломер у батьківських статевих клітинах можуть впливати на довжину теломер у клітинах нащадків і, таким чином, вносити вклад у спадкування лейкоцитарної довжини теломер, незважаючи на «репрограмування» теломер під час ембріонального розвитку [84]. Коротка довжина теломер може також призводити до так званих «теломерних синдромів»,

що виникають внаслідок генетичних мутацій і включають в себе легеневий фіброз, відмову кісткового мозку, дискератоз [85].

Багато фактів вказують на те, що на довжину теломер можуть сильно впливати навколишнє середовище та поведінкові фактори протягом життя. Серед важливих факторів, що впливають на динаміку довжини теломер протягом життя індивіда слід зазначити наступні: внутрішньоутробний розвиток, довжина теломер при народженні, інфекції, психо-емоційний стрес, паління, рівень глюкози і холестеролу в крові, вживання алкоголю, харчування [86-92].

Сучасні дослідження визначають важливість епігенетичних особливостей при інфікуванні SARS-CoV-2 та перенесеному захворюванні на COVID-19. Глобальна програма вакцинації проти SARS-CoV-2 активно триває, і незабаром захворюваність на COVID-19 у всьому світі значно зменшиться. Тим не менш, серед мільйонів тих, хто пережив COVID-19, багатьом знадобиться довготривала допомога через посилення клінічних наслідків після COVID-19, визначених як ПКС (пост-ковідний синдром) [93,94]. Незважаючи на кілька проявів, пов’язаних з ПКС, існує брак потенційно значущих молекулярних біомаркерів для моніторингу виникнення та еволюції ПКС. Раніше було встановлено, що біологічний вік, визначений як DNAmAge, може бути змінений за наявності вірусних або бактеріальних інфекцій [95,96,97], а також той факт, що коротші теломери асоційовані з ризиком розвитку більш тяжких симптомів COVID-19 [98]. Також було встановлено суттєво більше вкорочення теломер в групі з ПКС у порівнянні з контрольною групою і найбільш суттєвими ці відмінності були серед населення молодше 60 років [99].

Проте, незважаючи на результати попередніх досліджень багато чого залишається невідомим про вплив біологічного віку на здоров’я легенів та епітелію після зараження SARS-CoV-2 через відсутність відповідного алгоритму та інвазивної процедури, яку повинні пройти пацієнти. Патофізіологія при основа цих висновків залишається неясною; однак вони можуть відображати модифіковану епігенетику довкілля, що особливо помітно серед молодих людей, які пережили COVID-19.

Прогресування старіння пов'язане з критичними метаболічними змінами. Деякі з цих змін відбуваються на рівні метаболітів, що регулюють функцію ключових епігенетичних ферментів, наприклад, зниження рівня NAD+, кофактора сиртуїнів [100], і зменшення альфакетоглутарової кислоти [101], кофактора для всіх діоксигеназ [102]. Хоча це дуже спекулятивно, можливо, літні люди відносно менш чутливі до SARS-CoV-2-залежних епігенетичних змін через зміни їх метаболічного ландшафту. Для з'ясування цього важливого аспекту необхідні додаткові експерименти. У світлі цього міркування може бути інше питання, чи можуть епігенетичні зміни існувати перед першим вірусним контактом, зберігаючись або, можливо, поступово погіршуватися до періоду після COVID-19.

Декілька епігенетичних явищ пов'язують із інфекцією SARS-CoV-2 [55], включаючи епігенетичну регуляцію ACE2 та IL6. Саме зміна експресії IL6 пов'язують з розвитком гірших симптомів COVID-19 через надмірне запалення [103]. Крім того, було виявлено, що SARS-CoV-2 індукує зміни метилювання ДНК, які впливають на експресію генів, що пригнічують імунну відповідь, що частково може сприяти несприятливому прогресуванню COVID-19 [104]. Також важливо зазначити, що нещодавно було ідентифіковано характерну зміну профілю 44 варіативно метильованих CpG ділянок геному який дозволяє прогнозувати ризику розвитку тяжких симптомів після зараження SARS-CoV-2 [105]. Обговорюється можливість того, що епігенетичні зміни, які характеризують високий ризик розвитку тяжкого перебігу захворювання на COVID-19 можуть перекриватися з тими, які асоційовані зі старінням. Зважаючи на це, метою нашого дослідження було аналіз асоціації між довжиною теломерних ділянок хромосом лейкоцитів периферійної крові та перенесеною інфекцією SARS-CoV-2 у жінок репродуктивного віку.

З початку поширення пандемії коронавірусної інфекції, експерти ВОЗ вважали, що новий ковід не має особливої небезпеки для вагітних, так як вагітні не є чутливішими до зараження ніж загальна популяція. Але коли спалах нової хвобори перетворився в повномасштабну пандемію і відлік інфікованих ковід жінок збільшився в рази, тоді стало зрозуміло, що пацієнтки потрапляють у

відділення реанімації у 1,5 рази частіше [106]. Ці дані були доповнені шведськими вченими, які вважають що, жінки в 5 разів частіше потрапляють у відділення інтенсивної терапії та в 4 рази частіше потребують штучної вентиляції легенів та становлять менш як 6 % усіх госпіталізованих через ковід [107]. Чим старша жінка, тим більший ризик госпіталізації з ковідом. При цьому потрібно відмітити, що тяжка форма ковіду розвивалася далеко не всіх інфікованих жінок. Фізіологічні зміни, що відбуваються в період вагітності роблять жінку більш вразливою для тяжких інфекцій, так як цей стан характеризується ослабленим імунітетом при якому серцево-судинні потреби підвищені. Цей стан компенсованого респіраторного алкалозу з метаболічним ацидозом є вразливим для респіраторних захворювань , таких як COVID-19. У пацієнток з ковідом значно частіше виникали ускладнення, які загрожували не тільки здоров‘ю але й життю жінки [107,108]. Нещодавні дослідження виявили зв‘язок між тяжкими випадками інфікування COVID-19 та цитокіновим штормом, для якого характерне збільшення концентрації речовин інтерлекіна-2 у плазмі [109]. У вагітних жінок у 1 та 3 триместрі, цитокіновий шторм, викликаний Sars-Cov2 може призвести до тяжкого неконтрольованого запалення. Вважають, що у тяжких випадках COVID-19 цитокіновий шторм пов`язаний із системним руйнуванням тканин і подальшим несприятливим прогнозом. Зміна обсягу легень і вазодилатація можуть призвести до набряку слизової оболонки і збільшення секреції у верхніх дихальних шляхах. Крім того, зміни клітинного імунітету спричинюють підвищення сприйнятливості у жінок до інфікування внутрішньо-клітинними організмами, такими як віруси. Щоб адаптуватися до підвищення споживання кисню на 10-20 % і збільшити вентиляцію легень приблизно на 40 %, підвищений рівень прогестерону у жінок посилює дихальну активність та парціальний тиск кисню [110]. Передбачається, що ця модульована імунна система може захистити жінок від синдрому цитокінового шторму і пов`язаних з ним захворюваності і смертності, так як у деяких жінок з тяжким перебігом COVID-19 є лабораторні докази сильної запальної реакції. Тому жінки з COVID-19 знаходяться у стані інфекції та гіпоксії, з посиленням запальних чинників, слабкою скорочувальною здатністю матки і підвищеним ризиком

кровотечі. Ускладнення інфекції, також включають ГРДС, ураження міокарду жінок та можливе порушення інших систем органів. Факторами ризику, які впливають на тяжкість перебігу COVID-19, є вік жінки - більше 35 років, індекс маси тіла, супутні захворювання жінок, потреба у кисневій терапії під час госпіталізації, тютюнопаління, а також цукровий діабет, що передує пре еклампсії та гестаційній артеріальній гіпертензії [111]. Є досліди, які показують, що жіноча імунна активація при COVID-19 збільшує кількість IL-17a, які викликають розлад аутистичного спектру і порушення розвитку [112]. При цьому безсимптомні жінки можуть не мати високого ризику тяжкого захворювання. Причина смерті є вторинною, так як ковід підсилює хронічні хвороби та викликає поліорганну недостатність. Проте, в разі ковіду у жінок ризик індивідуальний залежить не від статистики, а від супутніх захворювань: гестаційного цукрового діабету, гіпертензії, ожиріння та віку. В принципі жінки дітородного віку не належать до групи ризику. В разі коронавірусної інфекції багато залежить від генетичних особливостей конкретної людини [113].

За час пандемії було встановлено, що зараженню COVID-19 підлягають не тільки дорослі, але й діти різних вікових груп. Однак, треба зазначити, що хвороба в них розвивалася значно рідше, ніж у дорослих, тільки 1,5 % випадків, хвороба у дітей проходить у безсимптомній та легкій формі, тяжкі випадки реєстрували дуже рідко 0,2 % випадків. За останній час, виходячи із нинішньої ситуації ці дані можуть змінюватися [114,107,109].

На етапі розповсюдження захворюваності на ковід, важливо визначити показники лабораторних предикторів, які дають можливість стратифіціювати ризик розвитку легких, середніх та важких форм захворювання, диференціювати низький та високий ризик смертності, що може оптимізувати лікування різних груп населення, особливо в групі посиленого ризику до якої відносять жінок.

Аналізуючи інформацію, наукових досліджень, можна припустити, що одним із чинників важкої форми хвороби може стати дефіцит вітаміну D [115]. Численні дослідження свідчать про те, що рівень вітаміну D менше 50 нМоль/л, зв‘язаний з рядом ускладнень - загроза передчасних пологів розвитком

плацентарної недостатності, перериванням вагітності, прееклампсії, формування гестаційного цукрового діабету, бактеріального вагінозу, збільшення ризику порушення скорочення активності матки, збільшення частоти оперативного родорозрішення, також дефіцит вітаміну D на ранніх термінах вагітності пов‘язаний із 5-ти кратним збільшенням розвитку прееклампсії, в основі патогенезу якої лежить плацентарна та ендотеліальна дисфункція та виражена запальна відповідь, яка порушує обмін речовин між організмом матері та плоду [116,111]. Вітамін D необхідний також для функціонування паращитовидних залоз, кишківника, нирок, кісткової, серцево-судинної та репродуктивної систем, відіграє істотну роль в абсорбції кальцію та фосфатів з кишківника в транспорті мінеральних солей і в процесі кальцифікації кісток, регулює виведення кальцію і фосфатів нирками. Бере участь у функціонуванні імунної системи і впливає на виробництво лімфокінів, має здатність модулювати активність Т і В лімфоцитів чим забезпечує адаптивний імунітет, тому для профілактики тяжкого перебігу коронавірусної інфекції, особливо в групах ризику, вітамін D відіграє важливу роль у зниженні виразності запальної реакції та цитокінових атак [117]. Оптимальний рівень вітаміну D знижує швидкість розмноження вірусу, концентрацію білків-цитокінів, які викликають запалення. Дефіцит вітаміну D збільшує вірогідність захворювання, а також ризик аутоімунних процесів у невагітних жінок. Залишається дискусійним питання про те, що рівень вмісту вітаміну D в організмі жінок, як фактора гострої фази, знижується внаслідок коронавірусної інфекції, ускладнена коронавірусною інфекцією є фактором ризику розвитку дефіциту вітаміну D [118].

Важливими біохімічними показниками у протіканні коронавірусної інфекції жінок можна також вважати ферменти: лактатдегідрогеназу (ЛДГ) та креатинкіназу (КК).

Лактатдегідрогеназа – цинковмісний внутрішньоклітинний фермент, який знаходиться майже в усіх клітинах організму у формі тетраметру. Визначення ізоформ ЛДГ в сироватці крові хворих має діагностичне значення для виявлення пошкоджень мембранних структур, що спостерігають при різних захворюваннях.

Тому цей фермент є неспецифічним показником тканинного пошкодження і активність його в крові збільшена при всіх станах, які супроводжуються пошкодженням клітинної мембрани. Також фермент каталізує реакцію перетворення піровиноградної кислоти в молочну за участю НАДН, а також зворотню реакцію, яка є кінцевим етапом анаеробного механізму окислення глюкози і джерелом енергії [110]. Хоч фермент не є специфічним, але цей тест використовується для діагностики інфаркту міокарду та легень. Джерелом підвищення активності ЛДГ може бути легенева тканина при емболії та інфаркті легень. Так, як фермент ЛДГ переважно знаходиться в тканинах, то збільшення його рівня в крові свідчить про їх розпад та руйнування клітин. Фермент є маркером метаболічних порушень дихальної та поліорганної недостатності та маркером швидкості загоєння пошкодженої тканини, також індуційованих гіпоксією деструктивних змін в різних тканинах при коронавірусі, який допомагає виявити рівень декомпенсації хронічних захворювань та оцінити ризики несприятливого перебігу хвороби [119].

Значне збільшення активності ЛДГ часто зустрічається у пацієнтів з COVID-19 у відділенні інтенсивної терапії, що може бути розцінений, як несприятливий прогноз при важких перебігах хвороби. Також підвищення вмісту ферменту в сироватці крові може свідчити, що порушення регуляції імунної системи та ендотеліальна дисфункція, активно залучені у патофізіологію COVID-19 як у вагітних, так і невагітних жінок [120].

Збільшення вмісту ферменту в сироватці крові свідчить про активну фазу хвороби і про розвиток ускладнень перебігу інфекції як у вагітних, так і у невагітних жінок. Але при цьому підвищений вміст ферменту лактатдегідрогенази у вагітних жінок є фізіологічним фактором. Для повноцінної діагностики аналіз концентрації ЛДГ у сироватці крові, проводять у комплексі з іншими показниками.

Креатинкіназа – внутрішньоклітинний фермент, який каталізує реакцію переносу фосфорного залишку з аденозинтрифосфату (АТФ) на креатин з утворенням креатинфосфату - високоенергетичного субстрату, який є джерелом енергії та біохімічних реакцій в організмі. Реакція, яка каталізується КК забезпечує

енергією м’язові скорочення та доступність великої кількості енергії за короткі проміжки часу. В крові здорової людини КК знаходиться в невеликій концентрації у вигляді ММ фракції, про те 90 % креатинкінази сироватки крові походить із скелетних м’язів [121]. Проникнення КК в кров у великій кількості відбувається при пошкодженні клітин, які її вміщують. Тому при збільшенні активності визначених ізомерів можливо зробити висновок, яка тканина пошкоджена. Також збільшення КК в крові можливе при пухлинних процесах, які можуть розвиватись як при первинному пошкодженні різних органів (запалення, травми, дистрофічні процеси) так і в наслідок їх пошкоджень при інших станах (метаболічні порушення та інтоксикація) [122]. Багато уваги в теперішній час приділяється питанню пошкодження при коронавірусній інфекції не тільки легеневої системи але і інших (нервової, шлунково-кишкової, ендокринної, серцево-судинної, а також шкіри та слизових оболонок). Пояснюється це тим, що основною мішенню при коронавірусній інфекції є ендотелій судин. Для проникнення в клітину вірус використовує рецептор Ангіотензинперетворюючий фермент 2 (АПФ 2) до якого може приєднатись від одного до трьох вірусів [112]. Ключовим моментом в патогенезі пошкодження внутрішніх органів при COVID-19 є взаємодія вірусу з ендотеліальними клітинами судин, розвиток гіперпроникнення та ендотеліальна дисфункція, порушення мікроциркуляції. В науковій літературі відмічається, що при COVID-19 найбільш важливе значення має гіперімунне запалення, зв’язане з продукцією протизапальних цитокінів, активацією апоптозу, розвитком васкулопатії, які супроводжуються запальною інфільтрацією скелетних м'язів, що в лабораторній діагностиці відображається підвищенням активності ферментів ЛДГ і КК. На думку деяких вчених в умовах продовження пандемії в клінічній практиці крім визначення типових для COVID-19 змін важливо проводити додаткові дослідження оцінки рівня КК і ЛДГ у коморбідних пацієнтів та моніторинг показників цих ферментів для верифікації пошкодження м'язової та серцевої систем [106].

При цьому, за даними лабораторних досліджень знижений вміст ферменту КК в сироватці крові, спостерігається під час вагітності, як фізіологічний фактор.

1.2 Матеріали та методи дослідження

Матеріали і методи дослідження, які використовувались при виконанні І етапу виконання проєкту в 2020 році були наступними:

Ретроспективно вивчено історії хвороби 60 дітей віком 6-18 років та 60 жінок фертильного віку, які знаходились на стаціонарному лікуванні в Київській дитячій міській інфекційній лікарні № 12 з приводу коронавірусної хвороби. Згідно розробленій анкеті, яка включала основні соціальні, медико-біологічні фактори ризику, створено електронну базу даних хворих.

Накопичення, коригування, систематизація результатів опитування і візуалізація отриманих результатів здійснювалися в електронних таблицях Microsoft Office Excel 2010. Статистична обробка матеріалів дослідження проводилась з використанням методів параметричного і непараметричного аналізу.

Оцінка вірогідності результатів вибіркового дослідження визначає в якій мірі зроблені для нього висновки можна перенести на генеральну сукупність.

Для оцінки вірогідності результатів вибіркових досліджень проводилось визначення середньої похибки відносного показника (m).

Середня похибка показує наскільки результат, отриманий при вибірковому дослідженні, відрізняється від результату, який міг би бути отриманий при суцільному дослідженні всієї генеральної сукупності.

Середня похибка m відносної величини P при значному числі спостережень (n>30) розрахована за формулою:

$$m = \sqrt{\frac{Pq}{n}} \tag{1.1}$$

де

n - число спостережень у вибірковій сукупності (при n<30 замість n використовується n-1);

P - відносний показник;

Q - величина, зворотна до показника, тобто вірогідність того, що дане явище не відбудеться:

$$q = 100 - P$$

(1.2)

Порівняння даних проводилося за допомогою критеріїв χ^2 Пірсона, χ^2 Пірсона Йейтса, точного критерію Фішера, що дозволяють оцінити значимість відмінностей між фактичною кількістю якісних характеристик вибірки.

Спочатку заповнювалась таблиця (2x2), рядки в якій представляють значення фактору, а стовпці - значення результату.

Вибірка	Наявність фактору		Розмір вибірки
	так	ні	
Вибірка 1	A	b	a+b
Вибірка 2	C	d	c+d
Сума	a+c	b+d	a+b+c+d

Розраховувалась очікувана кількість спостережень в кожній з клітинок:

(a+b)*(a+c)/(a+b+c+d)

(a+b)*(b+d)/(a+b+c+d)

(a+c)*(c+d)/(a+b+c+d)

(b+d)*(c+d)/(a+b+c+d)

(1.3)

Якщо найменше значення з чотирьох отриманих менше 5 - для порівняння використовувався точний критерій Фішера, якщо найменше значення знаходиться в інтервалі від 5 до 10 - використовувався критерій χ^2 квадрат Пірсона з поправкою на безперервність Йейтса, якщо більше 10 - використовувався критерій χ^2 квадрат Пірсона.

Значення точного критерію Фішера розраховувалось за такою формулою:

$$P = \frac{(a+b)! * (c+d)! * (a+c)! * (b+d)!}{a! * b! * c! * d! * n!}$$

(1.4)

де

n - загальне число досліджуваних в двох групах;

! - факторіал, що представляє собою добуток числа на послідовність чисел, кожне з яких менше попереднього на 1.

Значення критерію χ^2 квадрат Пірсона розраховувався за формулою:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{c} \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (1.5)$$

де

i - номер рядка (від 1 до r),

j - номер стовпця (від 1 до c)

Oij- фактична кількість спостережень в клітинці

ij, *Eij* - очікуване число спостережень в клітинці *ij*.

Значення критерію χ^2 квадрат Пірсона з поправкою на безперервність Йейтса визначався:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{c} \frac{(|O_{ij} - E_{ij}| - 0,5)^2}{E_{ij}} \quad (1.6)$$

Значення критерію χ2 порівнювався з критичними значеннями для (r - 1) × (c - 1) числа ступенів свободи. Якщо значення критерію χ2 більше критичного, робився висновок про статистичну значимість відмінності показників при відповідному рівні значущості.

В якості кількісної міри ефекту при порівнянні відносних показників використовувався показник відношення шансів (ВШ) з 95 % довірчим інтервалом. Відношення шансів дозволяє порівняти групи досліджуваних за частотою виявлення певного фактору ризику.

Показник відношення шансів (OR) розраховувався з таблиці (2x2) за формулою:

$$OR = \frac{a * d}{b * c}$$

(1.7)

Довірчий інтервал (95 % ДІ) розраховувався за формулами:

Формула знаходження верхньої межі:

$$\text{ДІ} = e^{\ln(OR)-1{,}96\sqrt{\frac{1}{a}+\frac{1}{b}+\frac{1}{c}+\frac{1}{d}}}$$

(1.8)

Формула знаходження нижньої межі:

$$\text{ДІ} = e^{\ln(OR)+1{,}96\sqrt{\frac{1}{a}+\frac{1}{b}+\frac{1}{c}+\frac{1}{d}}}$$

(1.9)

При відношенні шансів, що дорівнює одиниці, шанси виявити фактор ризику в порівнюваних групах однакова. Відповідно, фактор не робить ніякого впливу на ймовірність результату.

Додатково в кожному випадку обов'язково оцінюється статистична значимість відношення шансів виходячи з значень 95 % довірчого інтервалу. Якщо довірчий інтервал не включає 1, тобто обидва значення меж або вище, або нижче 1, робиться висновок про статистичну значимість виявленого зв'язку між фактором і результатом.

Аналіз клінічних даних та формування вибірок.

В рамках даної роботи проведено відбір неспоріднених індивідів з різних регіонів України. Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об’єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Популяційна група.

В якості популяційної вибірки досліджувалася група здорового населення з різних регіонів України, яка складалась зі 100 неспоріднених індивідів: 50 чоловіків та 50 жінок (середній вік 36,2±6,7 та 34,4±4,4 років відповідно).

Реактиви. Для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімеразу, ампліфікаційний буфер та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів виробництва фірми „Thermo Scientific" (Литва).

В роботі були використані додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), сахароза, TRITON X-100™, етилендиамінтетрааміноцтова кислота (ЕДТА), гідроксиметилметилен-амін (Tpic), агароза, бромід етидія, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA". Решта реактивів − вітчизняного виробництва марки «Макрохім».

Робочі розчини, які використовувались для досліджень: буфер ТЕ − 10mM Tpic-HCl; 1mM ЕДТА; 5х ТВЕ буфер − 0,89М Tpic-HCl; 0,89М борна к-та; 20mM ЕДТА; сахарозний буфер − 0,32 М сахароза; 5mM Tpic-HCl; 1х TRITON X100; 0,1М $MgCl_2$; протеїназний буфер − 10mM Tpic-HCl; 1mM ЕДТА (pH 8,0); 100mM NaCl; ампліфікаційний буфер для ПЛР − комерційний 10 кратний розчин, який містить $(NH_4)_2SO_4$, оптимізований для ПЛР із використанням Taq-полімерази;буфер для нанесення проб ДНК на агарозний гель − 0,1 % бромфеноловий синій, 0,1 % ксиленціанол, 30% гліцерол.

Виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові проводилось наступним шялхом: ДНК виділяли за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеіназою К з наступною фенольною екстракцією. Для виділення ДНК із крові до 1 об'єму холодної крові (1 мл) додавали 7-9 об'ємів холодного сахарозного буферу (див. пункт 2.2.) для лізису лейкоцитів з наступним осадженням клітинних ядер шляхом центрифугування при 2500 об./хв. при температурі 4°С протягом 15 хвилин. Осад ядер ресуспендували в 460 мкл протеїназного буфера. Далі додавали 10 %-ий розчин додецилсульфату натрію до кінцевої концентрації 0,5 % і протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Інкубації лізатів ядер тривала протягом 12-16 годин при температурі 370 С. Після інкубації здійснювали депротеїнізацію ядер шляхом послідовної екстракції фенолом (pH 8,0), сумішшю рівних об'ємів фенолу і хлороформу та хлороформом до зникнення інтерфази після центрифугування. Осад ДНК отримували додаванням 2-2,5 об'ємів холодного 96 % етилового спирту, з наступним центрифугуванням та

промиванням 70 % етиловим спиртом. Отриманий осад підсушували і розчиняли в ТЕ.

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками, а також шляхом електрофорезу в 1 %-ому агарозному гелі. Для визначення спектральних характеристик та концентрації ДНК використовували прилад ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні λ220 – λ300. При оцінці спектральних характеристик звертали увагу, щоб в зразках відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при λ260 та при λ280, вкладалося в рамки між 1,9 та 2,0, що показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків. Відношення λ260/λ230 для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Окрім цього проби ДНК перевіряли на наявність залишків фенолу, який поглинає при λ270. Відношення λ260/λ270 для ДНК без фенолу становить 1,2.

Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Аналіз послідовностей праймерів на специфічність проводили з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH за умов сканування геномної послідовності ДНК досліджуваного гена. Основні вимоги до дизайну були наступні: висока специфічність; якомога нижчий вміст гуанідину в послідовності; однакові температури плавлення для кожного з членів пари праймерів.

Оптимальні умови проведення ПЛР – склад реакційної суміші та температурно-часовий режим – дозволяють отримати достатню для детекції кількість високо специфічного продукту ампліфікації ДНК in vitro. З метою створення таких умов проведення реакції нами проводився аналіз послідовностей ДНК-матриць для ПЛР та відповідних фланкуючих праймерів. Критичними параметрами для реакційної суміші були: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Taq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними параметрами температурних режимів були: температура від палення праймерів на ДНК-матриці та температура синтезу. Важливими параметрами часових режимів були: співвідношення періоду денатурації до періоду від палення

праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальна кількість повних циклів реакції.

Ампліфікація ДНК in vitro. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоцикл ерах “2720 Thermal Cycler” фірми “Applied Biosystems”, а також і Cycler виробництва фірми „BIO-RAD” (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: ампліфікаційний буфер (див. пункт 2.2.); $MgCl_2$ – 2,5 мМ; бичачий сироватковий альбумін – 170 мкг/мл; dNTP – 400 мкМ кожного типу; термостабільну ДНК-полімеразу – 0,5 одиниць активності; олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного; ДНК – 100−300 нг.

Надалі пробірки з сумішшю вміщували в термоциклер, використовували оптимізовані режими проведення ПЛР. Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі. Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення ПЛР, то їх зберігали при $+4^0$С.

Ідентифікація мутацій методом ПДРФ. Даний метод аналізу нуклеотидної послідовності, оснований на ампліфікації *in vitro* фрагмента послідовності ДНК гена, що містить ділянку локалізації поліморфного варіанту з наступним гідролізом продукту ПЛР ендонуклеазою рестрикції, сайт впізнання для якої з'являється або зникає в результаті мононуклеотидної заміни (МНЗ). У тих випадках, коли не вдається підібрати ендонуклеазу рестрикції для такого аналізу, використовується один з варіантів методу ПЛР – метод наведення відповідного сайту рестрикції шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за допомогою ПЛР із неповністю гомологічними нуклеотидній послідовності ДНК-матриціолігонуклеотидними праймерами. Аналіз послідовності досліджуваних генів на наявність сайтів впізнавання для ендонуклеаз рестрикції проводили з використанням програми Invitrogen Vector NTI Advance 10.

Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі. Для проведення електрофорезу готували 5-кратний ТВЕ-буферний розчин. Для електрофорезу використовували 0,5 кратний ТВЕ- буферний розчин.

Продукти ПЛР фракціонували в 1,5-2 % агарозному гелі та забарвлювали 1% розчином етидіум броміду (інтеркалюючий барвник ДНК). Продукти ПЛР перед

нанесенням на гель змішували з відповідним розчином для нанесення у співвідношенні 3:1. Електрофорез проводили на приладі фірми „HELICON" (Росія) при кімнатній температурі та напруженості електричного поля 10-15 В/см гелю до візуального розділення аналізованих фрагментів. Візуалізацію проводили на УФ-трансілюмінаторі.

Аналіз однонуклеотидних замін в генах IL6, ACE1.

Аналіз поліморфного варіанту гену *IL6* проводили за допомогою ПЛР з наступним ПДРФ аналізом з використанням раніше описаних методик з власними модифікаціями. Послідовність праймерів, використаних в даному аналізі, температурні режими проведення реакцій та ендонуклеази рестрикції представлені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1 - Послідовності олігонуклеотидних праймерів, температурно-часові режими для проведення ПЛР та ендонуклеази рестрикції використані для проведення аналізу ПДРФ

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C	Ендонуклеази рестрикції
IL6	-174 G/C	F 5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' R 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'	58 (5 циклів) 54 (30 циклів)	*Nla*III

Аналіз поліморфізму I/Dінсерціонно-делеційного поліморфізму гена ACE1 проводили шляхом специфічної полімеразно ланцюгової реакції з детекцієюампліфікаційних фрагментів в кінцевій точці з використання праймерів: 5' CTGGAGAGCCACTCCCATCCTTTCT 3'

5' GACGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'.

Ампліфікацію *in vitro* специфічної послідовності ДНК досліджуваних локусів проводили в автоматичному режимі, який складався із 2 стадій. Після початкової денатурації при 94°С протягом 5 хвилин кожна стадія відбувалася в 3 етапи: денатурація - 94°С (30 с), відпалювання праймерів (30-45 с), елонгація - 72°С (30-

40 с); при цьому на І стадії – 5 циклів температура відпалювання праймерів була вищою, для запобігання ампліфікації неспецифічних ПЛР-продуктів, а ІІ стадія – 25 циклів із пониженням температури відпалювання. Фінальна елонгація тривала 7 хвилин при 72°С.

Успішність проходження реакції ПЛР, а також та відсутність контамінації реакційної суміші аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали специфічні для кожної МНЗ ендонуклеази рестрикції в кількості 3 в.о.а та проводили рестрикцію протягом 12-16 годин при температурі 37ºС. Продукти ПЛР та продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Аналіз поліморфного варіанта ss469415590 гена IFNL4 методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена IFNL4 нами було розроблено методику з використанням сайт-специфічної ПЛР. Для проведення сайт-специфічної ПЛР використовували 3 специфічних олігонуклеотидних праймери, один спільний та два специфічних для кожного з алель них варіантів - ss469415590ΔG та ss469415590TT. В процесі дизайну праймерів для аналізованої послідовності враховували наступні обмеження. По-перше, між послідовностями генів родини інтерферонів λ існує високий ступінь гомології. По-друге, послідовність ДНК, яка фланкує досліджуваний поліморфізм здатна утворювати димери та шпильки з показниками вільної енергії до -4,7 ккал/моль. З метою підвищення специфічності роботи праймерів та уникнення формування димерів волігонуклеотидні послідовності були внесені не комплементарні основи. Отримані послідовності праймерів наведені в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2 - Послідовності олігонуклеотидних праймерів, використані для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4*

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C
IFNL4	ss469415590	Com 5'-TCCTTTACACGGTGATCGCAGC-3' ΔG 5'-TCCTTTACACGGTGATCGCAGAA-3' TT 5'-TGATTGACCCTGAGCCTGCG-3'	62

Температурно-часові умови ампліфікації були наступними: початкова денатурація - 94°C (5 хв), 30 циклів: денатурація - 94°C (30 с), відпалювання праймерів – 62°C (30-45 с), елонгація - 72°C (30-40 с); фінальна елонгація - 72°C (5 хв). Для кожного індивіда проводили дві ПЛР реакції, використовуючи дві ПЛР суміші зі спільним праймером та з одним із специфічних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2 %-ому агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів становить 299 п.н.

Статистична обробка отриманих генетичних результатів. Для розрахунку частот алелів та теоретично очікуваного розподілу генотипів, показників фактичної і теоретичної гетерозиготності, розрахунку показника $\chi 2$ використовували пакет комп'ютерних програм "Genepop".

При проведенні імунологічних досліджень проаналізовано сироватки крові 64 хворих що перехворіли на коронавірусну інфекцію (17 у важкій формі тяжкості та 47 середня ступінь тяжкості). З них 33 жінки та 30 дітей. Контрольну групу склали 24 здорові жінки без захворювань протягом півроку. Також для контролю дослідили 690 зразків сироватки крові на рівні IgG та IgM антитіл та в окремих випадках досліджували динаміку антитіл протягом розвитку захвалювання. Для контролю спектру антитіл до Cov19 досліджували зразки сироваток пацієнтів що перехворіли 3 та 5 місяців тому.

Антитіла до кардіоліпіну та фосфатедилсерину також визначалися оригінальною ІВФ системою із використанням міжнародних GPL контролів.

Були визначені антитіла класів IgG, IgA та IgM до Cov19 визначали методом ІВФ за допомогою тест-систем “VitoTest” згідно інструкції виробника.

Авідність антитіл класів IgG визначали оригінальним методом ІВФ використовуючи коронавірусні пептиди люб’язно надані “VitoTest” .

Вміст інтерлейкіну-8 (IL-8) та розчинного рецептору до інтерлейкіну-2 (sCD25) визначали ІВФ системами BD bioscience (USA) згідно рекомендаціям виробника.

Визначення вітаміну D проводилась за допомогою набору 25-OH Вітамін D ИФА, який застосовується для кількісного визначення загального 25-OH Вітамін D (Вітамін D_2 та D_3) ІФА в сироватці або плазмі крові людини. Визначення активності креатинкінази проводилось за допомогою набору реагентів Креатинкіназа NAC LIQUID, які застосовують для визначення активності креатинкінази в сироватці і плазмі.

Матеріали і методи дослідження, які використовувались при виконанні ІІ етіпу досліджень, який включав І етап виконання проєкту в 2021 році були наступними:

Реєстрація випадків хвороби COVID-19 проводилась на основі даних первинної облікової документації № 058/0 «Екстрене повідомлення про інфекційне захворювання, харчове, гостре професійне отруєння, незвичайну реакцію на щеплення», затвердженої наказом МОЗ України від 10 січня 2006 року №1, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 08 червня 2006 року за № 686/12560.

Застосовувались методи статистичної оцінки та епідеміологічного аналізу відповідних даних «Центру громадського здоров’я МОЗ України», «Державного центру статистики України», Департаменту охорони здоров’я виконавчого органу Київської міської ради, ДУ «Чернівецькій обласний лабораторний центр МОЗ України», ДУ «Львівський обласний лабораторний центр МОЗ України», ДУ «Тернопільський обласний лабораторний центр МОЗ України», ДУ «Миколаївський обласний лабораторний центр МОЗ України».

Поширеність коронавірусної (SARS-CoV2) інфекції розраховувалась як число випадків на 100 тисяч населення за 2020 рік та перший квартал 2021 року.

В якості кількісної міри ефекту при порівнянні відносних показників використовувався показник відношення шансів (ВШ) з 95 % довірчим інтервалом.

Якщо довірчий інтервал не включає 1, тобто обидва значення меж або вище, або нижче 1, робиться висновок про статистичну значимість виявленого зв'язку між фактором і результатом.

Оцінку ступеня впливу факторних ознак проводили за показником ВШ.

В рамках даної роботи проведено відбір біологічних зразків периферійної крові у дітей (група обстеження І), яка складалася з 70 пацієнтів, що захворіли на COVID-19 і проходили лікування в умовах стаціонару. Вік пацієнтів був у межах 2,5-17 років. До даної групи увійшли діти у яких захворювання протікало без ускладнень (20 пацієнтів), діти у яких спостерігали легкі інтерстеціальні зміни в тканинах легенів (33 пацієнта), та діти з виявленою пневмонією (17 пацієнтів). Групу обстеження ІІ (70 пацієнтів) складали жінки, які хворіли на COVID-19 і також проходили лікування в умовах стаціонару. Вік хворих знаходився в межах 22-49 років. Жінок у яких захворювання протікало без ускладнень (26 пацієнток), кількість хворих у яких спостерігали легкі інтерстеціальні зміни в тканинах легенів (34 пацієнтки), та жінки з виявленою пневмонією (10 пацієнток).

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об’єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

В якості популяційної вибірки досліджувалася група здорового населення з різних регіонів України, яка складалась зі 100 неспоріднених індивідів: 50 чоловіків та 50 жінок (середній вік 36,2±6,7 та 34,4±4,4 років відповідно).

Для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімеразу, ампліфікаційний буфер та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів виробництва фірми „ Thermo Scientific” (Литва).

В роботі були використані додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), сахароза, TRITON X-100^{TM}, етилендиамінтетрааміноцтова кислота (ЕДТА), гідроксиметилметилен-амін (Тріс), агароза, бромід етидія, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA". Решта реактивів − вітчизняного виробництва марки «Макрохім».

Робочі розчини, які використовувались для досліджень: буфер ТЕ − 10mM Тріс-HCl; 1mM ЕДТА; 5х ТВЕ буфер − 0,89М Тріс-HCl; 0,89М борна к-та; 20mM ЕДТА; сахарозний буфер − 0,32 М сахароза; 5mM Тріс-HCl; 1х TRITON X100; 0,1M $MgCl_2$; протеїназний буфер − 10mM Тріс-HCl; 1mM ЕДТА (pH 8,0); 100mM NaCl; ампліфікаційний буфер для ПЛР − комерційний 10 кратний розчин, який містить $(NH_4)_2SO_4$, оптимізований для ПЛР із використанням Taq-полімерази; буфер для нанесення проб ДНК на агарозний гель − 0,1% бромфеноловий синій, 0,1% ксиленціанол, 30% гліцерол.

ДНК виділяли за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеіназою К з наступною фенольною екстракцією. Для виділення ДНК із крові до 1 об'єму холодної крові (1 мл) додавали 7-9 об'ємів холодного сахарозного буферу для лізису лейкоцитів з наступним осадженням клітинних ядер шляхом центрифугування при 2500 об./хв. при температурі 4^0С протягом 15 хвилин. Осад ядер ресуспендували в 460 мкл протеїназного буфера. Далі додавали 10-відсотковий розчин додецилсульфату натрію до кінцевої концентрації 0,5 % і протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Інкубації лізатів ядер тривала протягом 12-16 годин при температурі 37^0 С. Після інкубації здійснювали депротеїнізацію ядер шляхом послідовної екстракції фенолом (pH 8,0), сумішшю рівних об'ємів фенолу і хлороформу та хлороформом до зникнення інтерфази після центрифугування. Осад ДНК отримували додаванням 2-2,5 об'ємів холодного 96 % етилового спирту, з наступним центрифугуваням та промиванням 70 % етиловим спиртом. Отриманий осад підсушували і розчиняли в ТЕ.

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками, а також шляхом електрофорезу в 1 % агарозному гелі. Для визначення спектральних характеристик та концентрації ДНК використовували прилад ND-1000

Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні λ220 – λ300. При оцінці спектральних характеристик звертали увагу, щоб в зразках відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при λ260 та при λ280, вкладалося в рамки між 1,9 та 2,0, що показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків. Відношення λ260/λ230 для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Окрім цього проби ДНК перевіряли на наявність залишків фенолу, який поглинає при λ270. Відношення λ260/λ270 для ДНК без фенолу становить 1,2.

Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної ПЛР був наступним*:* аналіз послідовностей праймерів на специфічність проводили з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH за умов сканування геномної послідовності ДНК досліджуваного гена. Основні вимоги до дизайну були наступні: висока специфічність; якомога нижчий вміст гуанідину в послідовності; однакові температури плавлення для кожного з членів пари праймерів. Оптимальні умови проведення ПЛР – склад реакційної суміші та температурно-часовий режим – дозволяють отримати достатню для детекції кількість високо специфічного продукту ампліфікації ДНК in vitro. З метою створення таких умов проведення реакції нами проводився аналіз послідовностей ДНК-матриць для ПЛР та відповідних фланкуючих праймерів. Критичними параметрами для реакційної суміші були: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Taq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними параметрами температурних режимів були: температура відпалення праймерів на ДНК-матриці та температура синтезу. Важливими параметрами часових режимів були: співвідношення періоду денатурації до періоду відпалення праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальна кількість повних циклів реакції.

Проводиоась ампліфікація ДНК in vitro. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклерах "2720 Thermal Cycler" фірми "Applied Biosystems", а також iCycler виробництва фірми „BIO-RAD" (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: ампліфікаційний буфер (див. пункт 2.2.); $MgCl_2$ – 2,5 мМ; бичачий сироватковий альбумін – 170 мкг/мл; dNTP – 400 мкМ кожного типу;

термостабільну ДНК-полімеразу – 0,5 одиниць активності; олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного; ДНК – 100−300 нг. Надалі пробірки з сумішшю вміщували в термоциклер, використовували оптимізовані режими проведення полімеразної ланцюгової реакції. Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі. Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення ПЛР, то їх зберігали при $+4^0$С.

Був проведений аналіз поліморфізму ДНК методом ПЛР в реальному часі із застосуванням мічених флуоресцентними агентами олігонуклеотидних зондів, комплементарних послідовності продукту ПЛР (TaqMan) . Метод ПЛР в реальному часі було вперше описано у 1996 році групою вчених Heid et al., Gibson et al. для кількісної оцінки експресії генів за допомогою гідролізних зондів або TaqMan зондів, які генерують флуоресцентний сигнал при розщепленні завдяки явищу резонансного переносу енергії флуоресценції (від англ. FRET – fluorescence resonance energy transfer). Розщеплення зондів відбувається за рахунок наявності 5’-3’екзонуклеазної активності полімерази. Такі зонди представляють собою олігонуклеотиди, мічені репортерним флуорофором з одного кінця та гасником флуоресценції – з іншого (такий комплекс не випромінює флуоресцентного сигналу за рахунок явища FRET) та гібридизуються всередині фланкованого праймерами фрагмента матриці (рис. 1.1). При розщепленні полімеразою репортерний флуорофор вивільняється від гасника флуоресценції та генерує флуоресцентний сигнал. Цей процес відбувається при кожному циклі ампліфікації, а рівень флуоресценції прямо пропорційний до кількості продукту ПЛР. Для детекції точкових мутацій використовується система з двох зондів TaqMan, один з яких гібридизується на мутантній послідовності та мітиться одним репортерним флуорофором, а інший – на нормальній та містить відмінний флуорофор. Таким чином можливо диференціювати нормальний, гетерозиготний та мутантний генотип. Ще одним підходом, який широко застосовується для детекції мутацій є використання флуоресцентних ДНК інтеркалюючих барвників. Цей підхід було вперше описано Higuchi et al. 1993 р. Найбільш популярним є барвник SYBR GreenI, який інтеркалює у маленьку боріздку дволанцюгової ДНК, що значно

посилює його флуоресценцію (рис. 1.1). Аналогічно до зондів, рівень флуоресценції барвника буде зростати пропорційно до кількості ампліконів. Перевагою цього підходу в порівнянні з використанням зондів типу TaqMan є те, що його можна застосувати з будь-якими праймерами. ПЛР в реальному часі – це лабораторний метод, основою якого є ПЛР, який використовується для одночасної ампліфікації та вимірювання кількості даної молекули ДНК. Метод ПЛР в реальному часі включає одночасно детекцію та якісне/кількісне визначення (вимірюється кількість копій досліджуваної ділянки безпосередньо, або опосередковано відносно внесеній стандартній кількості ДНК чи додаткових калібрувальних генів) специфічної послідовності ДНК у зразку. Окрім кількісного аналізу досліджуваної послідовності ДНК, ПЛР в реальному часі також застосовується для визначення мутацій різного типу та однонуклеотидних поліморфізмів SNP's. Даний метод в принципі реалізує загальні принципи ПЛР, основна відмінність полягає в тому, що після кожного циклу ампліфікації вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі. Типи ПЛР в реальному часі розрізняються за способами генерації репортерної флуоресценції. Два основних принципи - це:

1. Застосування інтеркалюючих флуоресцентних агентів, флуоресценція яких значно зростає при звязуванні з дволанцюговою ДНК;
2. Застосування мічених флуоресцентними агентами олігонуклеотидних зондів, комплементарних послідовності продукту ПЛР (технології TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler тощо).

Інтеркалюючі барвники, мають здатність активувати здатність до флуоресценції в результаті приєднання до ДНК. В якості інтеркалюючого барвника для ПЛР в реальному часі найчастіше застосовують SYBR Green або Eva Green. Ці барвники специфічно взаємодіють з дволанцюговою ДНК, при цьому зростає флуоресценція комплексу ДНК- барвник.

Ці барвники застосовуються для детекції продуктів ПЛР під час ампліфікації. Проте слід зазначити, що зростання флуоресценції може бути викликане не лише зростанням кількості специфічних продуктів ампліфікації, а також наявністю

неспецифічних продуктів (димери праймерів, шмери тощо). У зв'язку з цим детекція продуктів ПЛР з використанням цього підходу вимагає дуже ретельної оптимізації нуклеотидної послідовності праймерів та умов ампліфікації, а також додаткового вивчення отриманих ампліконів за допомогою аналізу кривих плавлення. Крім того, в деяких випадках виникає необхідність нормалізації сигналу флуоресценції барвника за допомогою пасивного референсного барвника, наприклад ROX (рис.1.1).

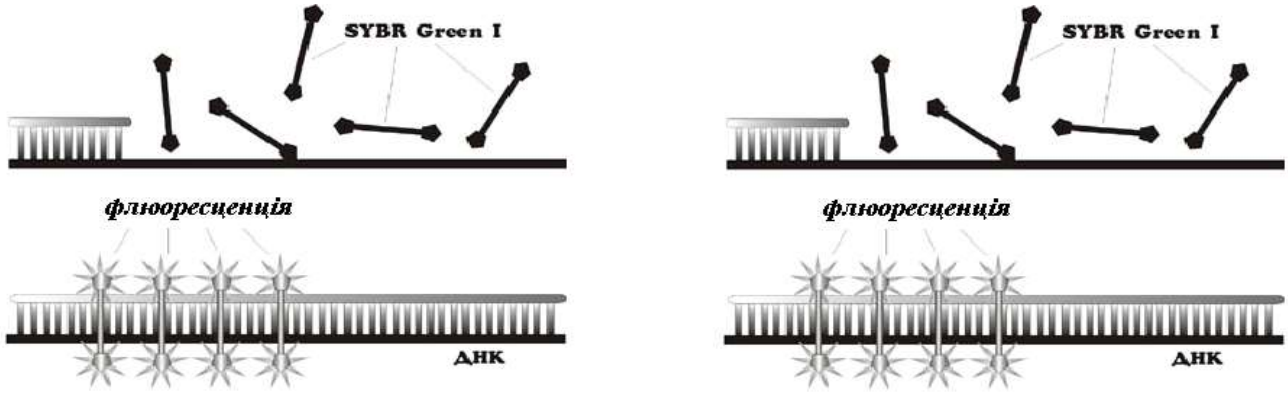


Рисунок 1.1 - Схематичне зображення випромінення світла барвником SYBR Green I в реакції ПЛР.

До другого типу методів із застосуванням принципу ПЛР в реальному часі відносяться методи, основані на використанні флуоресцентно мічених олігонуклеотидних зондів, серед них найбільш розповсюдженими є технології TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler. Принцип методу TaqMan полягає у застосуванні ДНК-зондів, мічених флуоресцентним барвником на 5'-кінці та специфічним гасником флуоресценції на 3'-кінці. Гасник флуоресценції - це молекула, спектр поглинання якої лежить в області довжин хвиль спектра випромінення флуорофора. Гасіння флуоресценції відбувається завдяки переносу енергії від молекули флуорофора до молекули гасника та розсіюванню енергії. Ці зонди гомологічні досліджуваній послідовності ДНК та під час стадії відпалення праймерів специфічно гібридизуються на цій послідовності, при чім чим більше ампліконів утворюється, тим більше зондів гібридизуються на матриці. На стадії

елонгації полімераза синтезує комплементарний ланцюг ДНК та при досягненні зонда починає його розщеплювати завдяки своїй 5’-екзонуклеазній активності, вивільнюючи флуорофор. Таким чином, зі зростанням кількості вивільненого флуорофора зростає рівень флуоресценції в системі, який є пропорційним кількості ампліконів, які утворилися в результаті ПЛР (рис. 1.2).

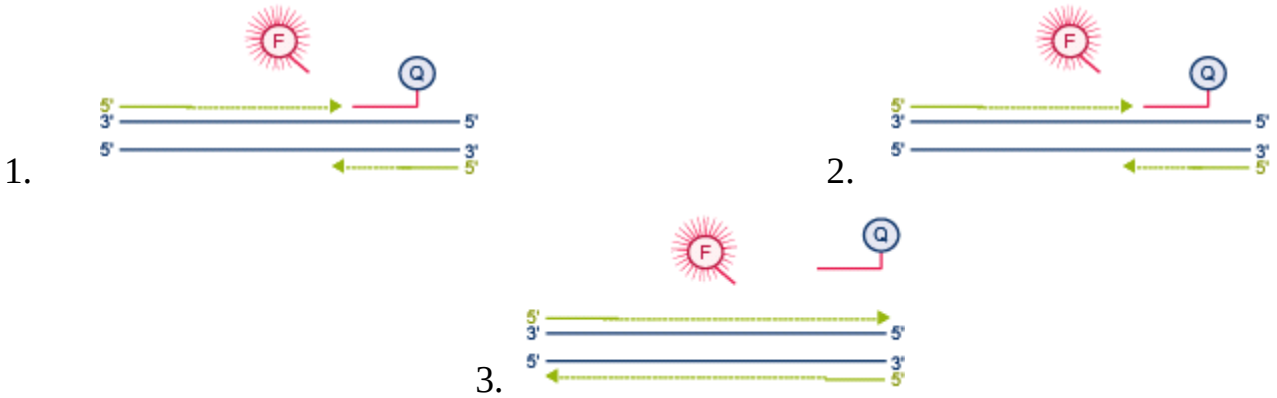


Рисунок 1.2 - Принцип детекції продуктів ПЛР з використанням зондів TaqMan

F- флуорофор, Q – гасник флуоресценції: 1) зонд відпалюється на одному з ланцюгів ДНК між парою праймерів. Флуоресценція флуорофора погашена; 2) Taq ДНК полімераза розщеплює зонд. Відщеплений флуорофор випромінює світло з характеристичною для нього довжиною хвилі; 3) подвоєння амплікону викликає розгоряння одного флуорофора. Модифікацією технології TaqMan є метод з використанням зондів з комплементарними кінцевими послідовностями «молекулярними маяками» Molecular Beacons. Дана методика відрізняється від попередньої лише тим, що кінцеві послідовності зонда являють собою взаємно комплементарні області з 5–6 основ, в результаті чого вони знаходяться в замкненому стані та утворюють «шпильки». Внутрішня частина зондів містить нуклеотидну послідовність, комплементарну досліджуваній ділянці. «Шпилька» зонду в процесі ПЛР денатурує, а кінці зонду розходяться в різні сторони, і він специфічно гібридизується на матриці. Під дією 5’-ендонуклеазної активності Taq-полімерази, зонд розщеплюється, флуорофор вивільнюється (рис. 1.3). В результаті зростає рівень флуоресценції.

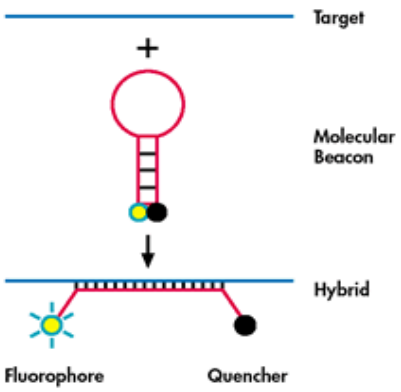


Рисунок 1.3 - Принцип детекції ПЛР-продуктів з використанням зондів Molecular Beacons.

Light Cycler – це метод, оснований на явищі частотного резонансного переносу енергії. Використовують два зонда з резонансним переносом енергії. Даний спосіб детекції накопичення продуктів ампліфікації відрізняється більшою специфічністю, оскільки зростання рівня флуоресценції відбувається при комплементарному одразу двох ДНК-зондів. Принцип методу заключається в переносі енергії від одного флуорофора, який знаходиться на 3`-кінці першого зонда, до другого флуорофора, який знаходиться на 5`-кінці другого зонда, відстань між зондами становить 1-5 нуклеотидів. При одночасному зв'язуванні обох зондів з ДНК-матрицею випромінення першого флуорофора передається на другий флуорофор, а його випромінення детектується приладом (рис. 1.4). Таким чином, зростає специфічність аналізу.

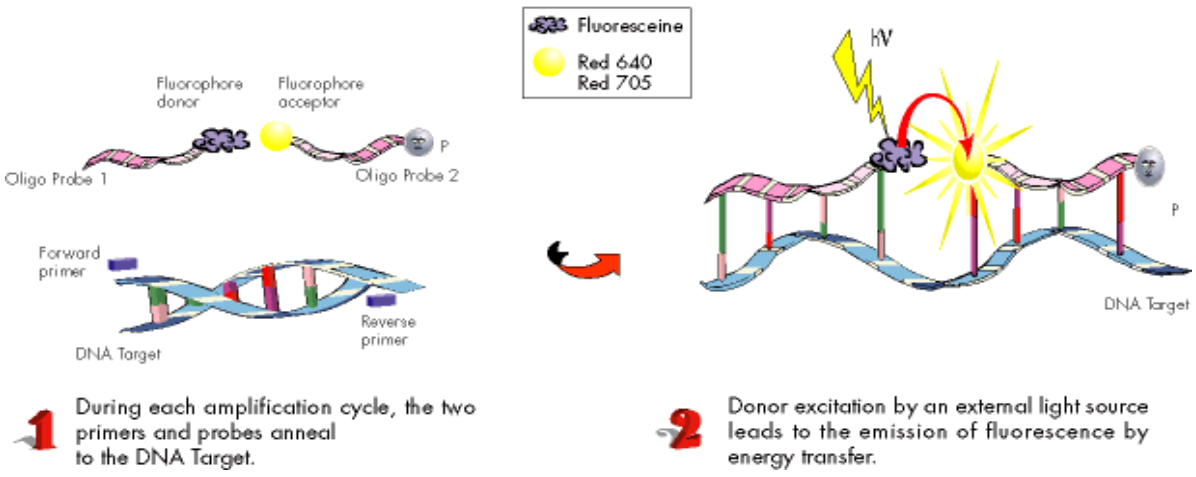


Рисунок 1.4 - Принцип детекції ПЛР-продуктів з використанням методу флуоресценції

За допомогою даних типів ПЛР в реальному часі можливо виявляти SNP та точкові мутації, а також проводити кількісний аналіз делецій/дуплікацій (з використанням референтного гена). На практиці найчастіше використовують методи ПЛР в реальному часі у варіанті з інтеркалюючими барвниками та технологію TaqMan, оскільки Molecular beacons та LightCycler коштують значно дорожче і їх використовують найчастіше у випадку, коли необхідна надспецифічна детекція лише одного з усіх ПЛР.

Таким чином, методику SYBR Green доцільно використовувати у випадку оптимізованої реакції, а також для кількісного або якісного визначення кількості лише одного продукту. SYBR Green добре працює приблизно до 35-37 циклу, при подальших циклах точність починає падати.

Методика TaqMan рекомендується у випадку роботи з вкрай малими кількостями матриці (наприклад, single cell PCR). Зонди TaqMan використовується для детекції в одній пробірці декількох продуктів ПЛР. Проте мультиплексування значно ускладнює оптимізацію реакції. Технології Molecular beacons та LightCycler коштують значно дорожче і їх використовують найчастіше у випадку, коли необхідна надспецифічна детекція лише одного з усіх ПЛР продуктів.

В дослідженні також проводилася алель-специфічна ПЛР в реальному часі. Для аналізу мутацій з використанням інтеркалюючого барвнику SYBR Green застосовували ампліфікаціну суміш PCR Maxima™ SYBR® Green Supermix фірми «Fermentas» (Вільнюс, Литва). Температурно-часовий режим для ПЛР оптимізувався для отримання специфічного продукту та високої ефективності ампліфікації

Для аналізу мутацій з використанням флуоресцентних зондів типу TaqMan проводили оптимізацію складу реакційної суміші та температурно-часового режиму.

Ампліфікацію проводили на приладі iQ5TM Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, США). Реєстрація флуоресцентного сигналу відбувалася наприкінці стадії елонгації. Отримані результати ПЛР оцінювалися із

використанням пакету програмного забезпечення BIO-RAD iQ5 Optical System Software V 2.0 (2006).

Для розрахунку частот алелів та теоретично очікуваного розподілу генотипів, показників фактичної і теоретичної гетерозиготності, розрахунку показника $\chi 2$ використовували пакет комп'ютерних програм "Genepop" та "Open Epi".

Дослідницьку групу для проведення імунологічних досліджень склали жінки фертильного віку (ЖФВ), що не мали хронічних та гострих інфекційних захворювань ендокринних та серцево-судинних ускладнень що перехворіли на CoV19 2-4 тижні тому (переважна більшість перенесла хворобу у безсимптомній або легкій формі). У зв'язку із легким перебігом інфекції пацієнтки не приймали кортекостероідних препаратів, антибіотиків та антикоагулянів. Це дає можливість порівнювати показники їх імунної системи із контрольною групою. Контрольною групою були жінки такого самого стану та віку що не хворіли на Cov19.

В дослідженні вивчалися Т клітинна танка імунної системи (рівні Т клітин, Т-хелперів, Т-цитотоксичних клітин, експресія KIR рецептору CD158a та маркеру хронічної активації HLA-DR). Досліджувалася специфічна гуморальна відповідь до антигенів Sarscov2 (IgG, IgM, IgA) та про-автоімунна відповідь (антитіла проти кардіоліпіну та фосфотидилсерину). Детально вивчалася система природньої резистентності (рівні НК клітин та експресія рецепторів на НК клітинах). Також визначалася цитотоксична активність НК клітин до пухлини К562.

Аналіз субпопуляції лімфоцитів периферійної крові визначалися методом проточної цитометрії на приладі FacsCan (BD bioscience) використовуючи мічені (Fitc, PE, PeCy5) моноклональні антитілі (BD bioscience) проти CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD158a, CD335 та HLA-DR. Аналізували за допомогою програми CellQuest (BD bioscience).

Визначення цитотоксичної активності NK клітин розпочинався з приготування мішеней. В якості мішені використовували лінію К562 (суспензійна культура клітин ериторомієлолейкозу людини). Культуру клітин культивували у середовищі RPMI-1640, яке вміщувало 10 % ембріональної телячої сироватки. За добу до постановки НК тесту, клітини розводили 1/1 свіжим середовищем для

забезпечення log фази росту. Для тесту клітини відмивали та доводили до концентрації $5*10^6$/мл та мітили живі клітини вітальним маркером CFDA (карбокси-2,7-дихлорофлуоресцеїн диацетат, при гідролізі внутрішньоклітинними естеразами формує карбоксифлуоресцеїн диацетат, який здатний до флуоресценції). Через 30 хв мічені клітини тричі відмивали DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline – фізіологічний розчин, забуферений фосфатом Дульбекко, «Sigma», США).

Виділення мононуклеарів периферійної крові проводили наступним: 4мл гепаринізованої периферичної крові розводили 8 мл DPBS та розділяли на градієнті щільності Histopaque™-1077 (“Sigma”, США) 30 хв при 400 g. Мононуклеари периферичної крові (МПК) тричі відмивали DPBS, підраховували у камері Горяєва та доводили до концентрації $3*10^6$/мл у середовищі RPMI, яке вміщувало 10% бичачої сироатки (“Sigma”, США).

Для проведення НК тесту мононуклеари крові інкубували з міченою К562 у співвідношеннях 30/1, 15/1, 7,5/1 та інкубували 4 год у CO_2 інкубаторі (“Revco”, Швейцарія). Після інкубації додавали 10 мкл (5 мг/мл) розчину пропідій йодид (PI) та інкубували 20 хв при t+4С. Аналізували на приладі FACSCan (Becton Dickinson), (клітини-мішені, мічені CFDA, мали зелену флюоресценцію, а пермобілізовані мертві клітини (PI^+) - червону флюоресценцію).

Було проведено визначення аКЛ, аФС та аФЕ антитіл в дослідних сироватках. Виявлення антитіл IgG класу проводили прямим твердофазним імуноферментним методом. Лунки планшету (Nunc polysorp) покривали 20 мкл спиртового розчину кардіоліпіну 50 мкг/мл, фосфатидилсерину 50 мкг/мл або фосфатидилетаноламіну 50 мкг/мл (Sigma), контрольні лунки покривали спиртом 20 мкл та залишали за температури $(+37)^0$С до повного випаровування спирту в умовах постійного струшування. Після промивання ФСБ планшет блокували 0,25 % БСА (Sigma) у веронал-медіналовому буфері 0,02М (рН 8,6) 1 годину за температури $+37^0$С. Після промивання ФСБ до лунок додавали 100 мкл досліджуваної або контрольної сироватки, розведеної 1/50 RPMI з 0,1 % БСА, 0,01 % Твін 20. Після 1-годинної інкубації у лунки додавали по 100 мкл розчину

кон’югату пероксидази хрону з козячими антитілами, специфічними до γ-ланцюга IgG людини, що містив 0,1 % БСА, 1 % козячої сироватки та 0,01 % Твін 20. Після годинної інкубації планшет промивали ФСБ та проводили візуалізацію, як вказано вище. Позитивними вважали значення аКЛ та аФС вищі 10 GPL. В якості стандартів використовували контрольні зливні сироватки прокалібровані до зразків отриманих з лабораторії стандартизації антифосіоліпідних антитіл (США) [159,160].

При визначенні антитіл до Sarsov2 досліджували IgG, IgM та IgA проти Sarsov2 визначалися ІФА методом за допомогою тест систем фірми VITROTEST згідно інструкції виробника. Результати обчислювали у Індексі позитивності (ІП) де ІП<0,9 відповідає негативним рівням, а ІП >1,1 позитивним.

Визначення сироваткових рівнів IgG IgM IgA проводили методом Манчіні.

Вибір легких та середніх форм перебігу хвороби перш за все пов'язаний із можливістю оцінити імунну реакцію на перебіг вірусного процесу, бо важкі стани пов’язані із вживанням кортикостероїдів, що унеможливлюють оцінку імунних механізмів боротьби з вірусом.

Здорові жінки, що склали контрольну групу також були перевірені на рівні антитіл до COVID-19 (Total Ab vitritest). Пацієнтки заперечували перенесення COVID-19 інфекції та у переважної більшості з їх слів навіть не було контактів з COVID-19 інфікованими. Проте у 52 з 138 (38,4 %) були виявлені позитивні рівні антитіл до COVID-19. Частина після виявлення антитіл згадували щодо наявності незначних симптомів ГРВІ, проте переважна більшість не робила тест ПЛР і не зверталася до закладів охорони здоров’я. Таким чином, ці умовно здорові жінки з позитивними рівнями антитіл до COVID-19 були вилучені з групи контролю і доповнили групу жінок, що перенесли COVID-19 і в результаті було отримано велику групу жінок, що перенесла COVID-19 безсимптомно чи малосимптомно.

Визначення вітаміну D проводилась за допомогою набору 25-OH Вітамін D ІФА, який застосовується для кількісного визначення загального 25-OH Вітамін D (Вітамін D_2 та D_3) ІФА в сироватці, або плазмі крові людини. Визначення активності креатинкінази проводилось за допомогою набору реагентів

Креатинкіназа NAC LIQUID, які застосовують для визначення активності креатинкінази в сироватці і плазмі.

Визначення стану серцево-судинної системи у жінок, що перенесли коронавірусне інфікування проводилось за допомогою зібраного портативного приладу реєстрації електрокардіографічних змін та розробленого нами до нього програмного забезпечення. Було обстежено 120 ЖФВ, які перенесли коронавірусну хворобу, ці жінки склали основну групу щодо вивчення стану ССС. Прилад базується на мікроконтроллері ATmega328, та має робочу напругу 5В, флеш пам'ять 32кб та тактову частоту 16 МГц та платі розширення AD8232, яка дозволяє проводити діагностику різниці біологічних потенціалів. Після зборки та тестування приладу до нього приєднується блок електродів, які за класичною схемою реєстрації електрокардіографічного сигналу передають дані біопотенціалів до приладу.

Датчик ЕКГ з одноразовими електродами кріпиться безпосередньо до грудної клітки для виявлення кожного серцебиття. Електроди датчика ЕКГ перетворюють серцебиття в електричний сигнал. Датчики ЕКГ дуже легкі, тонкі та точні для вимірювання безперервного серцебиття та подання даних про частоту серцебиття.

Електроди датчика ЕКГ мають 3 точки прикріплення і з'єднані кабелем довжиною 30 дюймів. Завдяки цьому датчик ЕКГ легко підключається до контролера і розміщується на талії або кишені. Крім того, плагін для кабелю є звуковим штекером, завдяки якому кабель легко знімається або вставляється на плату підсилювача. Всі електроди датчиків мають можливість кріплення на тілі. Розроблене нами програмне забезпечення дозволяє в режимі реального часу проводити аналіз електрокадіографічних даних та давати попереднє заключення, щодо необхідності отримання медичної допомоги від сімейного лікаря або направлення хворого до стаціонару.

Контрольну групу для дослідження стану серцево-судинної системи склали ССС130 жінок, які проходили лікування в умовах відділення «Проблем здоров’я жінок фертильного віку» ДУ «ІПАГ ім. акад. О.М. Лук’янової НАМН України» за

рік до настання епідемії коронавірусної хвороби. Достовірність різниці виявлення змін електрокардіографічних показників проводили застосовуючи тест ксі квадрат та програмне забезпечення пакету Excel Microsoft Office.

Статистичну обробку проводили за допомогою прикладних програм MS® Excel® 2003™, та SigmaPlot® 13.0. Достовірність даних для незалежних вибірок вираховували із застосуванням непарного t-критерію Student та одновибіркового t-критерію (розподіл за W-критерієм Shapiro-Wilk був близьким до нормального), чи U-критерію Wilcoxon-Mann-Whitney; аналіз якісних ознак – за критерієм c2. Різницю вважали вірогідною при $p<0,05$.

Матеріали і методи дослідження, які використовувались при виконанні II етіпу досліджень, який включав II етап виконання проєкту в 2021 році були наступними:

Клініко-епідеміологічні дослідження проведені в популяції ЖФВ та дітей, мешканців різних регіонів України: західний регіон – Львівська, Чернівецька та Тернопільська області, центральний регіони – Київська область східних регіон – Харківська область та північний - м. Київ.

В результаті проведених клініко-епідеміологічних досліджень на ЖФВ та на дітей була створена комп’ютерна база даних та з’ясована частота і структура найбільш частих змін соматичного здоров'я, особливостей РЗ та психосоматичного здоров’я та визначення факторів ризику їх порушень у ЖФВ в залежності від їх форми у обстежених жінок та змін стану соматичного здоров'я і психосоматичного здоров’я та визначення факторів ризику їх порушень у дітей.

За допомогою математичного аналізу проводилась оцінка прогностичної значущості різних факторів ризику [123]. Рівень довіри при обчисленні довірчих інтервалів проводився за методом нормального розподілу Вальда [124].

При епігенетичних дослідженнях проводився аналіз клінічних даних та формування вибірок. В рамках даної роботи проведено відбір біологічних зразків периферійної крові у жінок репродуктивного віку (32 особи), які не хворіли на COVID-19 (контрольна група 1). Групу обстеження 2 (74 пацієнтки) складали

жінки, які хворіли на COVID-19 і також проходили лікування в умовах стаціонару. Вік хворих знаходився в межах 22-49 років.

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Для проведення досліджень використовувались реактиви, зокрема для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімеразу, ампліфікаційний буфер та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів виробництва фірми „Thermo Scientific" (Литва). В роботі були використані додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), сахароза, TRITON X-100^{TM}, етилендиамінтетрааміноцтова кислота (ЕДТА), гідроксиметилметилен-амін (Tpic), агароза, бромід етидія, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA". Решта реактивів − вітчизняного виробництва марки «Макрохім». Також для досліджень використовувались робочі розчини: буфер ТЕ − 10mM Tpic-HCl; 1mM ЕДТА; 5х ТВЕ буфер − 0,89М Tpic-HCl; 0,89М борна к-та; 20mM ЕДТА; сахарозний буфер − 0,32 М сахароза; 5mM Tpic-HCl; 1х TRITON X100; 0,1М $MgCl_2$; протеїназний буфер − 10mM Tpic-HCl; 1mM ЕДТА (pH 8,0); 100mM NaCl; ампліфікаційний буфер для ПЛР − комерційний 10 кратний розчин, який містить $(NH_4)_2SO_4$, оптимізований для ПЛР із використанням Taq-полімерази; буфер для нанесення проб ДНК на агарозний гель − 0,1 % бромфеноловий синій, 0,1 % ксиленціанол, 30 % гліцерол.

ДНК виділяли з лімфоцитів периферійної крові за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеіназою К з наступною фенольною екстракцією. Для виділення ДНК із крові до 1 об'єму холодної крові (1 мл) додавали 7-9 об'ємів холодного сахарозного буферу для лізису лейкоцитів з наступним осадженням клітинних ядер шляхом центрифугування при 2500 об./хв. при температурі 4°С протягом 15 хвилин. Осад ядер ресуспендували в 460 мкл протеїназного буфера. Далі додавали 10 %-ий розчин додецилсульфату натрію до кінцевої концентрації 0,5 % і протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл.

Інкубації лізатів ядер тривала протягом 12-16 годин при температурі 370С. Після інкубації здійснювали депротеїнізацію ядер шляхом послідовної екстракції фенолом (pH 8,0), сумішшю рівних об'ємів фенолу і хлороформу та хлороформом до зникнення інтерфази після центрифугування. Осад ДНК отримували додаванням 2-2,5 об'ємів холодного 96 % етилового спирту, з наступним центрифугуваням та промиванням 70 % етиловим спиртом. Отриманий осад підсушували і розчиняли в ТЕ. Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками, а також шляхом електрофорезу в 1 %-ому агарозному гелі. Для визначення спектральних характеристик та концентрації ДНК використовували прилад ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні λ220 – λ300. При оцінці спектральних характеристик звертали увагу, щоб в зразках відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при λ260 та при λ280, вкладалося в рамки між 1,9 та 2,0, що показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків. Відношення λ260/λ230 для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Окрім цього проби ДНК перевіряли на наявність залишків фенолу, який поглинає при λ270. Відношення λ260/λ270 для ДНК без фенолу становить 1,2.

Ампліфікація ДНК in vitro проводилась ПЛР в автоматичному режимі на термоциклерах “2720 Thermal Cycler” фірми “Applied Biosystems”, а також і Cycler виробництва фірми „BIO-RAD” (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: ампліфікаційний буфер; $MgCl_2$ – 2,5 мМ; бичачий сироватковий альбумін – 170 мкг/мл; dNTP – 400 мкМ кожного типу; термостабільну ДНК-полімеразу – 0,5 одиниць активності; олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного; ДНК – 100−300 нг.

Надалі пробірки з сумішшю вміщували в термоциклер, використовували оптимізовані режими проведення ПЛР. Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі. Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення ПЛР, то їх зберігали при $+4^0$С.

Визначення довжини теломер лейкоцитів проводилось за допомогою методу мультиплексної монохромної кількісної ПЛР. Кількісна ПЛР – є одним із найпростіших методів, що не вимагає великої кількості початкової ДНК і полягає у вимірюванні сигналу від реплікованих теломерних послідовностей відносно сигналу референсного гену (single copy gene) [125].

Більшість основних методів для визначення довжини теломер є досить кропіткими та дороговартісними. У той же час, ПЛР – є одним із найпростіших і порівняно недорогих методів, і, разом із цим, досить точним та добре відтворюваним. Незважаючи на велику кількість накопичених результатів, вивчення довжини теломер лейкоцитів є досить перспективним напрямком для впровадження у діагностичну практику. Протокол для визначення відносної середньої довжини теломер (ВСДТ) кожного зразка методом кількісної монохромної мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ) був запропонований R.Cawthon [126].

Для постановки ПЛР-РЧ використовували стрипи із восьми пробірок, сумісних із ампліфікатором Bio-Rad Chromo4. У кожну пробірку вносили 18 мкл суміші для ПЛР і 2 мкл ДНК. Реакційна суміш була приготовлена на основі «Набору для проведення ПЛР-РЧ у присутності інтеркалюючого барвника EvaGreen (виробництво – Solis BioDyne) відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Для проведення ММКПЛР пару теломерних праймерів telg і telc (кінцева концентрація – по 450 нмоль кожного) та пару альбумінових праймерів albu і albd (кінцева концентрація кожного з 250 нмоль) додавали у ММ. Профілі термоциклювання були такими: перший етап – 15 хв при 95°С; другий етап складався із 2-х повторів: 15 с при 94°С, 15 с при 49°С; і 32 цикли по 15 с при 94°С, 10 с при 62°С, 15 с при 74°С, детекція, 10 с при 84°С і 15 с при 88°С, детекція.

Чотири концентрації референсної ДНК, які охоплювали діапазон 27-кратного розведення, були отримані внаслідок серії розведень і проаналізовані у двох паралельних пробах для кожної постановки ПЛР; ці дані використовували для побудови калібрувальних кривих, за допомогою яких оцінювали ВСДТ. Всі зразки ДНК були проаналізовані у трьох повторах. При відпрацюванні методики для

встановлення довжини ампліконів та перевірки наявності неспецифічних продуктів проводили електрофорез у 12 % поліакриламідному гелі із використанням 1х Трис-боратного буферу. Гель електрофорез проходив при 5 V/см протягом 1 години. Після закінчення електрофорезу гель фарбували у розчині бромистого етидію з подальшою детекціює продуктів на трансілюмінаторі.

Після завершення термоциклювання для генерування двох стандартних кривих була використана програма Opticon Monitor 3: одна крива – для теломерного сигналу (T) та інша – для сигналу від однокопійного гена (S). За циклом виходу (Ct) за допомогою калібрувальної прямої було визначено кількість теломерної ДНК щодо референсної ДНК, аналогічно були отримані дані для кількості альбумінової ДНК. Значення ВСДТ отримували за допомогою співвідношення T/S.

Для визначення абсолютної ДТЛ в 10 зразках геномної ДНК було проведено повногеномне секвенування ДНК у Theragen Etex на секвенаторі HiSeqX. Обробку FASTQ файлів проводили з використанням програмного забезпечення BWA-mem, Samtools та Telomerecat (Farmery, 2018). BWA-mem використовували для вирівнювання рідів отриманих на секвенаторі. Для вирівнювання використовували версію референсного геному GRCh38. Для генерації BAM файлу використовували Samtools. Telomerecat використовували для розрахунку абсолютної середньої ДТ з BAM файлу. Перевагою Telomerecat є можливість фільтрації рідів, що містять теломерні повтори, але походять від субтеломерних ділянок або інтерстиціальних теломерних повторів. Крім того, однією з переваг методу є здатність до розрахунку середньої ДТ за допомогою оцінки кількості хромосомних кінців з субтеломерних рідів, а не за загальною кількістю рідів (покриття).

При статистичному аналізі для перевірки нормальності розподілу змінних використовували тест Шапіро-Вілка. Для нормально розподілених числових даних були розраховані середнє значення і стандартне відхилення (SD), а для ненормально розподілених – медіана (Me) та міжквартильний діапазон (QI-QIII). Парні порівняння незалежних показників проводили за допомогою t-критерію Стьюдента та порівняння між медіанами проводили за допомогою тесту Манна-Уітні (U-тест). Так як значення показника T/S не відповідали нормальному розподілу ($P < 0.001$),

для аналізу використовували методи непараметричної статистики. Для визначення різниці для номінальних даних був використаний точний тест Фішера. Для оцінки коефіцієнтів шансів (OR) та 95 % довірчих інтервалів (CI) для зв'язку між співвідношенням T/S (залежна змінна) та незалежними змінними використовувались моделі багатоваріантної логістичної регресії (MLR – multivariate logistic regression).

При імунологічних дослідженнях проводили аналіз субпопуляцій лімфоцитів, визначення антитіл до Sarsov2.

Субпопуляції лімфоцитів периферійної крові визначалися методом проточної цитометрії на приладі FacsCan (BD bioscience) використовуючи мічені (Fitc, PE, PeCy5) монокланальні антитілі (BD bioscience) проти CD3, CD4, CD8, CD16, CD14, CD19, CD56, CD158a, CD335, та HLA-DR. Аналізували за допомогою програми CellQuest (BD bioscience).

IgG, IgM та IgA проти Sarsov2 визначалися ІФА методом за допомогою тест систем фірми VITROTEST згідно інструкції виробника. Результати обчислювали у Індексі позитивності (ІП) де ІП<0,9 відповідає негативним рівням а ІП >1,1 позитивним.

Визначення сироваткових рівнів IgG IgM IgA проводили методом Манчіні.

Визначення вітаміну D проводилась за допомогою набору 25-ОН Вітамін D ІФА, який застосовується для кількісного визначення загального 25-ОН Вітамін D (Вітамін D_2 та D_3) ІФА в сироватці, або плазмі крові людини. Визначення активності креатинкінази проводилось за допомогою набору реагентів Креатинкіназа NAC LIQUID, які застосовують для визначення активності КК в сироватці і плазмі.

Статистичну обробку проводили за допомогою прикладних програм MS® Excel® 2003™, та SigmaPlot® 13.0. Достовірність даних для незалежних вибірок вираховували із застосуванням непарного t-критерію Student та одновибіркового t-критерію (розподіл за W-критерієм Shapiro-Wilk був близьким до нормального), чи U-критерію Wilcoxon-Mann-Whitney; аналіз якісних ознак – за критерієм c2. Різницю вважали вірогідною при p<0,05.

2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

2.1 Результати досліджень та їх обговорення І етапу виконання проєкту в 2020 року

2.1.1 Вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у дітей

В таблиці 2.1 представлено демографічні показники включених у дослідження дітей. Результати статистичного та математичного обрахування вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у дітей, представлені у вигляді таблиць в Додатку 1 до розділу 2, підрозділу 2.1.1, в томі ІІ.

Серед обстежених дітей переважали хлопчики – ((51,7±6,5) %), в той час як дівчата складали ((48,3±6,5) %). У віковому аспекті перевагу мали діти 6-12 років ((55±1,9) %). Статистичної різниці відповідно до віку досліджених дітей не виявлено.

Серед дітей, які були включені у дослідження на етапі 2020 року, середньо-тяжкий перебіг коронавірусної хвороби – 19 мали ((81,7±5,0) %) дітей, тяжку форму даного захворювання перенесли ((18,3±5,0) %) дітей.

Не встановлено вірогідної статистичної відмінності залежності віку та статті від тяжкості перебігу коронавірусної хвороби – 19 (табл. 2.2).

Аналізуючи соціальні фактори ризику серед обстежених дітей встановлено, що перевагу мали діти з повних сімей ((78,3±5,3) %), де рівень освіти батьків був вищий ((53,3±6,4) %). У більшості сімей мати не працювала ((50,0±6,5) %), працюючи батьки склали ((51,7±6,5) %). Серед працюючих батьків переважали службовці ((48,4±6,5) %). Хоча матеріальний стан сім'ї оцінювався згідно опитуванню і це складно об'єктивно інтерпретувати, однак середній рівень достатку вказали ((61,7±6,3) %) респондентів. Переважна кількість дітей мешкала в квартирі ((75,0±5,6) %) і задовільні санітарно-гігієнічні умови зазначили ((86,7±4,4) %) опитуваних.

Аналіз частоти зустрічає мості соціальних та санітарно-гігієнічних факторів ризику відповідно віку обстежених дітей представлено в таблиці 2.3.

Як видно з таблиці 2.3. при аналізі соціальних та санітарно-гігієнічних умов мешкання в залежності від віку встановлена вірогідна різниця частоти зустрічає мості окремих факторів ризику в групах спостереження. Так, у віковій групі підлітків визначено більшій відсоток дітей (59,26 %, p=0,045), у яких реєструвалась зайнятість матерів, що поряд із ще одним фактором неповної сім'ї (у 33.3 %, p=0.048) можливо знижувало контролювання за дітьми щодо соціального дистанціювання. У цій віковій групі також достовірно частіше визначено низький матеріальний стан сім'ї (у 33.3 %, p=0.048), мешкання у гуртожитку (у 29,63 % дітей, p<0,05) та незадовільні санітарно-гігієнічні умови вдома (у 25,93 %, p<0,05), що розглядаються як загальновідомі фактори негативного впливу на стан здоров’я дітей.

У віковій групі 6-12 років вірогідно частіше визначались наявність повної сім'ї (у 87,88 %, p=0.048), які переважно мешкали у квартирі (87,88 %, p=0.025) з кількістю більше ніж 3 члени сім'ї (у 48,48 % випадків).

Аналіз частоти визначення соціальних та санітарно-гігієнічних факторів ризику в залежності від тяжкості перенесеної коронавірусної хвороби-19 у обстежених дітей представлено в таблиці 2.4.

Згідно проведеним дослідженням, що представлено в таблиці 2.4, не встановлено суттєвої різниці наявності досліджуваних соціальних та санітарно-гігієнічних факторів від перебігу перенесеної коронавірусної хвороби-19 у обстежених дітей, окрім факту професії працюючих батьків, а саме службовців, які переважали в групі дітей з тяжким перебігом захворювання. Так, серед працюючих матерів в групі дітей 13-17 років, які перенесли тяжку форму коронавірусну хворобу-19 всі три жінки (100 %) були службовцями.

Аналіз медико-біологічних факторів встановив, що вікову перевагу при народженні обстежених дітей серед матерів мали жінки віком від 21 до 30 років ((61,7±6,3) %), у яких у ((93,3±3,2) %) випадків пологи були фізіологічними. Всі діти (100,0 %) народились доношеними. За даними анкетування нормальну вагу

при народженні мали ((46,7±6,4) %) дітей, більше ніж 4 кг – ((5,0±2,8) %) та, нажаль, не вказали вагу ((48,3±6,5) %) опитуваних.

Серед обстежених дітей переважала нормостенічна конституція ((75,0±5,6) % дітей), астенічну мали ((13,3±4,4) %) і гіперстеничну – ((11,7±4,1) %) дітей.

За даними епідеміологічного анамнезу більшість дітей ((55,0±6,4) %) захворіли через контакт з хворими в сім'ї, наявність контакту з хворими в школі зазначили ((6,7±3,2) %) респондентів, а не визначеними були у ((38,3±6,3) %) опитуваних. Перебування за кордоном перед захворюванням вказали лише ((1,7±1,7) %) хворих.

Відомо, що на інфекційну захворюваність у дітей впливають такі фактори як вакцинальний статус, прийом вітаміну D. За даними медичної документації встановлено, що більшість дітей ((76,7±5,5) %) вакциновані згідно віку відповідно до календаря щеплень в повному обсязі. Переважна більшість дітей ((93,3±3,2) %) під час пандемії не приймала вітамін D.

Оцінюючу інфекційну захворюваність обстежених дітей за даними анкетування встановлено, що найчастіше діти хворіли на вітряну віспу ((43,3±6,4) % дітей).

Групу дітей з рекурентними респіраторними захворюваннями (більше 6-8 епізодів за рік) склали 1/3 обстежених хворих ((30,0±5,9) %). Перенесена пневмонія у віці до 3 років (період формування легенів) зареєстрована у ((8,3±3,6) %) дітей.

В таблиці 2.5, 2.6 наведено дані щодо розподілу частоти визначення медико-біологічних факторів ризику в залежності від віку дітей та тяжкості перенесеної коронавірусної хвороби-19 у обстежених дітей.

Згідно отриманим результатам дослідження, які представлені в таблиці 2.5, тільки вік матері при народженні вірогідно відрізнявся відповідно віку. Так, в групі дітей 6-12 років у 15 (45,45 %) хворих вірогідно частіше (p=0.002) реєструвався вік матері старше 30 років при народженні, а у дітей 13-17 років - від 21 до 30 років відповідно ((у 21 (77,8 %), p=0.021).

Серед перенесених дитячих інфекційних захворювань, вітряна віспа вірогідно частіше реєструвалась у дітей підлітків (у 17 (62,96 %), p=0.006).

Серед супутніх захворювань у обстежених дітей зареєстровані алергічні захворювання у ((10,0±3,9) %), включаючи бронхіальну астму (один випадок в групі середньо-тяжкого перебігу COVID-19). Поодинокі супутні захворювання, а саме: цукровий діабет (у 1 хворого), ожиріння (у 2 хворих), перенесений інфекційний мононуклеоз (у 4 дітей), пієлонефрит (1 дитини), міокардит (у 1 хворого) реєструвались у дітей з середньо-тяжким перебігом коронавірусної хвороби-19. У дітей з тяжким перебігом COVID-19 реєструвалась епілепсія (1 випадок), тетрапарез (у 1 хворого) та анемія (у 2 дітей). Згідно проведеному аналізу, не встановлена статистично значуща залежність між віком, статтю, тяжкістю перебігу COVID-19 та супутніми захворюваннями.

Таким чином, проведені дослідження щодо вивчення соціальних та медико-біологічних факторів ризику серед дітей, які перенесли COVID-19 дозволили визначити, що неповний та низький матеріальний стан сім'ї, зайнятість матері на роботі, незадовільні санітарно-гігієнічні умови вдома та мешкання у гуртожитку вірогідно частіше визначались в групі підлітків. Встановлені фактори ризику серед дітей підлітків можливо впливали на контроль соціального дистанціювання, гігієнічних профілактичних заходів та підвищували ризики інфікування.

2.1.2 Вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у жінок

В таблиці 2.7. представлено розподіл обстежених жінок за віком. Результати статистичного та математичного обрахування вивчення клініко-статистичних, медико-біологічних та соціологічних факторів ризику коронавірусного інфікування у жінок, представлені у вигляді таблиць в Додатку 2 до розділу 2, підрозділу 2.1.2, в томі II.

Як видно з наведених даних в таблиці 2.7 серед обстежених переважали жінки віком 31-35 років (40,0 %).

Для аналізу факторів ризику в залежності від віку всіх включених у дослідження жінок було розподілене на дві групи: I групу склали жінки віком до 30 років та II – старше 30 років.

В таблиці 2.8 наведено дані щодо розподілу обстежених жінок за тяжкістю перенесеної коронавірусної хвороби-19.

Відповідно тяжкості перебігу перенесеної COVID-19 серед обстежених переважали жінки з середньо-тяжким перебігом - 53 (88,3 %), легкий перебіг визначався у 6 (10,0 %) та одна жінка (1,7 %) мала важкий перебіг.

Аналізуючи соціальні фактори ризику серед обстежених жінок встановлено, що перевагу мали не працюючі жінки ((60,0±6,3) %). Серед працюючих жінок ((40,0±6,3) %) переважали службовці ((54,2±10,4) %), на другому місці за поширеністю були робітниці ((20,8±8,5) %) та приватні підприємці ((16,7±7,8) %).

За характером праці серед працюючих жінок респонденти відзначали переважно фізичне й розумове навантаження у ((62,5±10,1) %), а лише розумове – у ((37,5±10,1) %) випадків. Більшість жінок ((70,8±9,5) %) зазначили, що на роботі мають інтенсивне психоемоційне напруження. Серед негативних факторів, що впливали серед опитуваних жінок на робочому місці, 1/3 ((29,2±9,5) %) відзначили профшкідливості.

На запитання щодо благополуччя сімейного стану ((66,7±6,1) %) жінок дали позитивну відповідь.

Вищу освіту мали ((62,5±10,1) %) працюючих опитуваних жінок.

В таблиці 2.9 представлено розподіл частоти зустрічаємості соціальних факторів ризику в залежності від віку.

Згідно даних медичної документації встановлено, що нормостенічну конституцію мали ((73,3±5,7) %) жінок, астенічну – ((8,3±3,6) %) і гіперстеничну – ((8,3±3,6) %) обстежених пацієнтів. Не зазначено тип конституції у 6 хворих ((10,0±3,9) %). У переважної більшості жінок визначено правильну будову тіла у ((83,3±4,8) %).

Більшість жінок ((81,7±5,0) %) мали одну дитину, двоє дітей – ((11,7±4,1) %) та троє – ((1,7±1,7) %) респондентів, а ((5,0±2,8) %) не надали інформацію.

Як видно з представлених даних в таблиці 2.9 частота вивчених соціальних факторів ризику серед опитуваних жінок вірогідно не відрізнялась в залежності від віку.

Серед опитуваних переважали жінки, які вказали про фізіологічні пологи ((96,7±2,3) %) і тільки у 2 жінок реєструвались ускладнені пологи ((3,3±2,3) %).

За даними епідеміологічного анамнезу в сім'ях всіх обстежених жінок хворіли діти, чоловіки – лише у ((36,7±6,2) %) опитуваних та у однієї жінки – батьки.

Серед перенесених інфекційних захворювань у обстежених жінок переважали грип у ((98,3±1,7) %) пацієнтів та вітряна віспа у ((53,3±6,4) %) опитуваних.

При анкетуванні жінок встановлено, що супутній хронічний тонзиліт реєструвався у ((10,0±3,9) %) пацієнтів та поодинокі випадки хронічного бронхіту, гіпертонічної хвороби, ревматизму, хронічного гастриту, хронічного холециститу.

Аналізуючи медико-біологічні фактори ризику серед обстежених жінок в залежності від віку не встановлено вірогідних відмінностей (табл. 2.10)

Визначення розподілу медико-біологічних факторів у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування представлено в таблиці 2.11.

Після перенесеної коронавірусної інфекції жінки часто мали приступи задухи зі свистом в грудях і приступи чхання. Приступи задухи частіше мали жінки після 30 років, а приступи чихання мали частіше жінки до 30 років 11,1 %. Шанси появи таких симптомів - OR – 5,13. Такі жінки часто скаржились на відчуття важкої голови (71,7 %), при цьому у жінок до 30 років така ознака зустрічалась у 83,3 %, а після 30 років - у 67,7 %. Шанси появи таких симптомів - OR – 2,5. Жінки часто скаржились на підвищене серцебиття (15,0 %), що частіше зустрічалось у жінок до 30 років (33,3 %) та у жінок після 30 років – 7,1 %. Шанси появи таких симптомів – OR – 6,5. На підвищення температури тіла до високої температури скаржилось

23,3 % жінок, переважно жінки до 30 років (33,3 %) та дещо менше жінки після 30 років (19,0 %). Шанси появи таких симптомів – OR – 2,13. Частина жінок скаржилась на постійні головні болі (15,0 %), більше такі скарги були у жінок до 30 років (22,2 %) та у жінок після 30 років (11,9 %). Шанси появи таких симптомів – OR – 2,11. З анамнезу було з'ясовано, що частина жінок при коронавірусному інфікуванні (8,3 %) звернулась на 4 добу до лікаря з приводу захворювання. Жінки до 30 років при цьому становили 11,1 %, а після 30 років 7,1 %. Шанси появи цієї ознаки – OR – 1,63. Більшість жінок направлені в стаціонар за самозверненням (68,3 %), жінки до 30 років при цьому становили 94,4 %, а після 30 років 57,1 %. Шанси виникнення цієї ознаки становили OR – 12,75.

Щодо кількості днів знаходження в стаціонарі по 2 доби перебували 5,6 % жінок до 30 років проти 2,4 % після 30 років (OR - 2,41), 3 доби відповідно: 11,1 % проти 4,8 % (OR – 2,5) та 6 діб знаходилося 13,3 % обстежених жінок до 30 років (22,2 %), після 30 років (9,5 %) (OR – 9,71). Проведені клініко-лабораторні дослідження та спеціальні обстеження жінок з коронавірусним інфікуванням виявили, що нормальний аналіз сечі зустрічався у 48,3 % обстежених жінок, при цьому у жінок до 30 років (72,2 %), а після 30 років (38,1 %) (OR – 4,23). Підвищену кількість лейкоцитів в сечі мали 56,7 % жінок, до 30 років - 66,7 %, після 30 років - 52,4 (OR – 5,13). При ренилогічному дослідженні явища гострого бронхіту діагностувались у 8,3 % обстежених жінок, до 30 років – у 16,7 %, після 30 років – у 4,8 % (OR – 4,0).Показники загального аналізу крові за вмістом еритроциту був нижче норми був у 11,1 % до 30 років і у 2,4 % після 30 років (OR – 5,13). Знижена кількість тромбоцитів спостерігалась у 26,7 % жінок до 30 років – 38,9 %, після 30 років – 21,4 % (OR – 2,33). Нормальний вміст паличкоядерних нейтрофілів був у 76,7 % обстежених жінок, при цьому у жінок до 30 років – 94,4 % та після 30 років – у 69,0 % (OR – 7,62). Лімфоцити нижче норми були у 5,6 % жінок до 30 років та 2,4 % після 30 років (OR – 2,41), а вище норми відповідно у 55,6 % та у 28,6 % (OR – 3,13).

Таким чином, аналіз вивчених факторів ризику дозволив встановити тенденцію, що більшість жінок, які перенесли переважно середньо-тяжкий перебіг

коронавірусної хвороби-19 були: у віці старше 30 років та відносно здоровими, не працюючі, мали контакти з хворими в родині. Не встановлено вірогідних відмінностей в частоті соціальних та медико-біологічних факторів ризику в залежності від віку обстежених жінок.

2.1.3 Генетичні предиктори в організмі дітей і жінок з коронавірусним інфікуванням та можуть бути діагностичними критеріями прогнозу поширення і перебігу коронавірусної інфекції для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції

Поліморфізм I/D в гені *ACE* полягає в наявності (I – Insertion, 490 п.н.) або відсутності (D- Ddeletion, 203 п.н.) фрагмента розміром 287 нуклеотидів в 16-му інтроні гена *ACE*. Результати аналіза даногополіморфізму наведено на рис. 2.1. Розподіл генотипів та алельних варіантів досліджуваного поліморфізму наведено в таблиці 2.12.

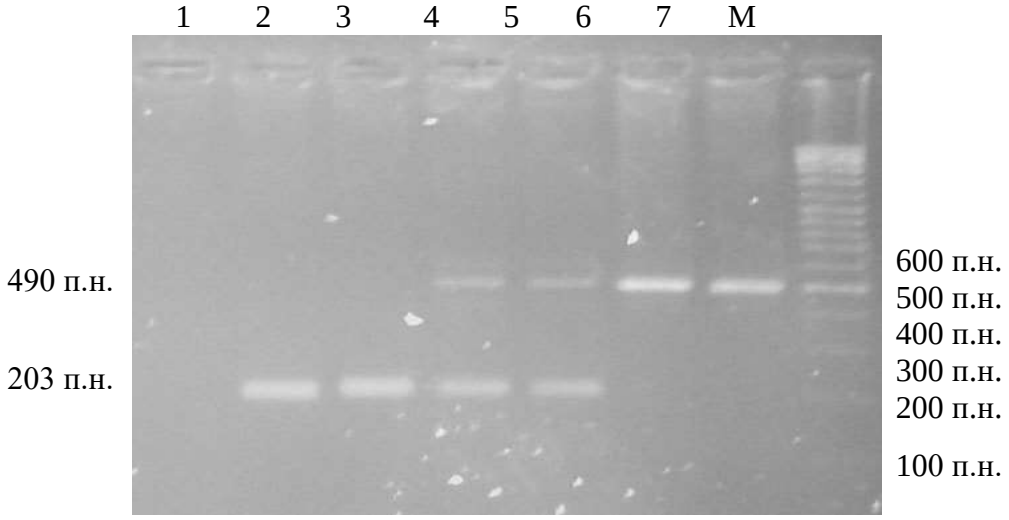


Рисунок 2.1 - Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР продукту гена *ACE* (I/D) в 2 % агарозному гелі. 1 – негативний контроль, 2,3 – II, 4,5 – I/D, 6,7 – DD, M – маркер молекулярної маси (Ladder 100 b.p.).

Банк ДНК контрольної групи: 100 осіб з загальної популяційної вибірки (середній вік 35 років).

Таблиця 2.12 - Розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму I/D в гені *ACE1* в контрольній групі здорових індивідів з України.

Група, Локус	Контроль I, (n=100)
ACE I/D	
Генотипи, n (%)	
II	18(0,18)
ID	51(0,51)
DD	31(0,31)
Алелі (%)	
I	0,435
D	0,565

Для аналізу послідовності ділянки ДНК промоторної ділянки гена *IL6*, що містить мононуклеотидну заміну - 174 G/C використовували метод ПЛР ампліфікації, з наступним гідролізом продукту ендонуклеазою рестрикції *NlaIII* та з подальшою візуалізацією у 2 %-ому агарозному гелі.

У випадку МНЗ з'являється один з сайтів впізнавання для ендонуклеази *NlaIII*. Тому у індивідів без мононуклеотидної заміни -174 G/C ми спостерігаємо фрагменти довжиною 167 п.н. та 31 п.н., у гетерозиготних носіїв мононуклеотидної заміни - 174 G/C спостерігаються рестрикційні фрагменти довжиною 167 п.н, 122 п.н., 45 п.н. та 31 п.н., а у гомозиготних носіїв мононуклеотидної заміни -174 G/C – рестрикційні фрагменти довжиною 122 п.н., 45 п.н. та 31 п.н.

На рисунку 2.2. зображена електрофореграма розділення фрагментів, що утворились після гідролізу продукту ампліфікації гена IL-6 ендонуклеазою рестрикції *NlaIII* в 2 % агарозному гелі. Фрагменти 45 п.н. та 31 п.н. не візуалізуються через їх невелику масу.

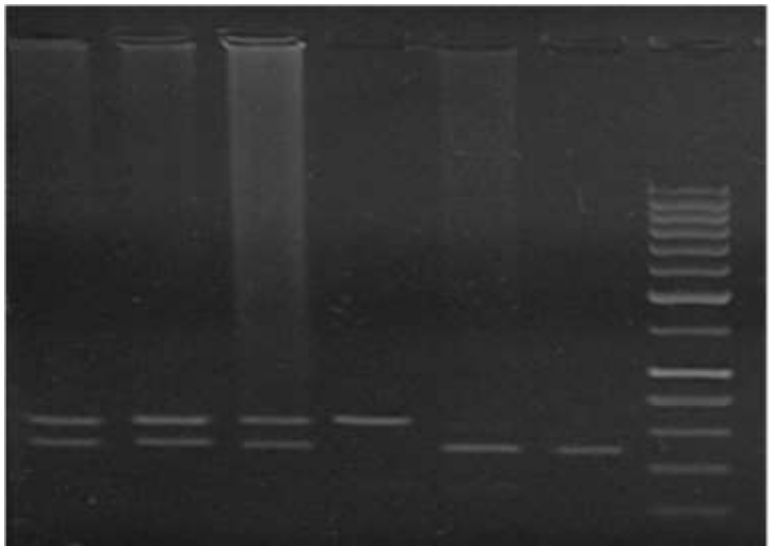


Рисунок 2.2 - Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL6*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *NlaIII*: 1, 2, 3 - CG (гетерозигота); 4 - GG (гомозигота); 5, 6 - CC (гомозигота); М – маркер молекулярної маси (50 п.н.).

Результати розподілу генотипів в контрольній групі індивідів за поліморфним варіантом -174 G/C наведено в таблиці 2.13.

Таблиця 2.13 - Розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму -174 G/C в гені *IL6* в контрольній групі здорових індивідів з України

Група, Локус	Контроль I, (n=88)
-174 G/C в гені IL6	
Генотипи, n (%)	
GG	30 (0,341)
GC	39 (0,443)
CC	19 (0,216)
Алелі (%)	
G	99 (0,562)
C	77 (0,438)

Для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена IFNL4 нами було розроблено методику з використанням сайт-специфічної ПЛР. Для кожного індивіда проводили дві ПЛР реакції, використовуючи дві ПЛР суміші зі спільним праймером та з одним із специфічних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2 %-ому агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів становить 299 п.н.

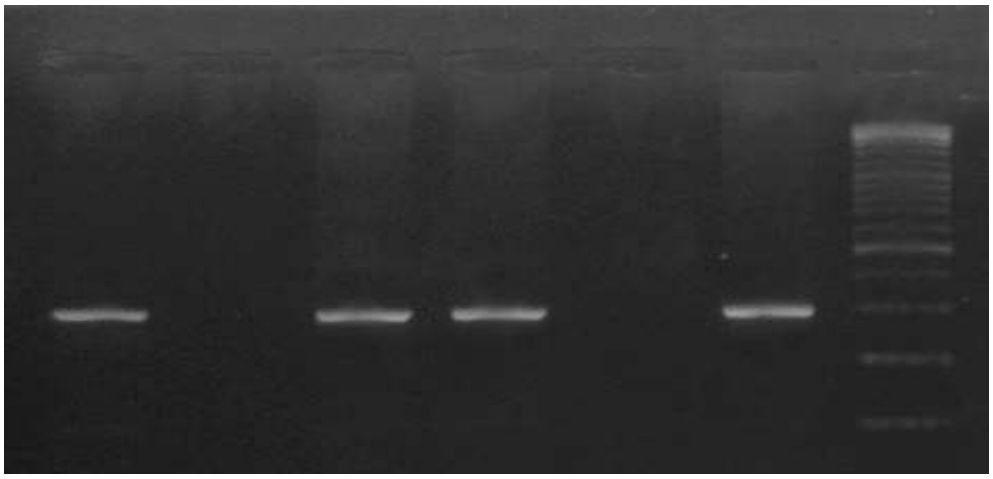


Рисунок 2.3 - Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IFNL4*, в 2 %-ому агарозному гелі: 1, 2 – TT/TT (гомозигота); 3, 4 – TT/ΔG (гетерозигота); 5, 6 – ΔG/ΔG (гомозигота); M – маркер молекулярної маси (100 п.н.)

Результати розподілу генотипів в контрольній групі індивідів за поліморфним варіантом ss469415590 наведено в таблиці 2.14.

Таблиця 2.14 - Розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму ss469415590 в гені IFNL4 в контрольній групі здорових індивідів з України.

Група, Локус	Контроль I, (n=100)
1	2
*IFNL4*ss469415590	
Генотипи, n (%)	
TT/TT	42 (0,42)
TT/ΔG	49 (0,49)

Продовження табл. 2.14

ΔG/ΔG	9 (0,09)
Алелі (%)	
TT	0,665
ΔG	0,335

Частоти генотипів за досліджуваними поліморфними локусамиACE1 (I/D) 17:61565890; IFNL4 rs469415590 ΔG/TT, IL6 7:22766840 -174 G/C відповідали теоретично очікуваним, згідно рівноваги Харді-Вайнберга ($p<0,05$), що свідчило на користь випадковому розподілу генотипів в контрольній популяційній вибірці здорового населення з різних регіонів України.

2.1.4 Визначення значення стану показників базового імунітету дітей та жінок після коронавірусного інфікування

Серологічні дослідження коронавірусного інфікування дозволили виявити антитіла лише у половини обстежених дітей та жінок, що можна пояснити наявністю у них іншого штаму коронавірусу, що співпадає з дослідженнями проведеними в США.

Отримані дані показали наявність позитивного титру IgM антитіл, але це не є ознакою свіжої інфекції (рис. 2.4). Наявність позитивного титру IgM антитіл може зустрічатась у пацієнтів, що вже одужали та навіть за 3-5 місяців після одужання.

Наявність лише IgM без позитивного рівня IgG теж зрідка зустрічається у пацієнтів що вже одужали. Проте діагностика рівнів IgM не очікувано виявила можливість спрогнозувати інфікування на ранніх етапах розвитку хвороби. Так було проаналізовано субпозитивні рівні IgM без позитиву за IgG (16 випадків) і у 8 випадках за 3-5 днів діагноз був підтверджений позитивним ПЛР тестом або наростанням рівня IgG. Наявність субпозитивного титру IgM у межах індексу

позитивності між (0,6-0,9) є імовірною ознакою свіжого інфікування із імовірністю 1/3.

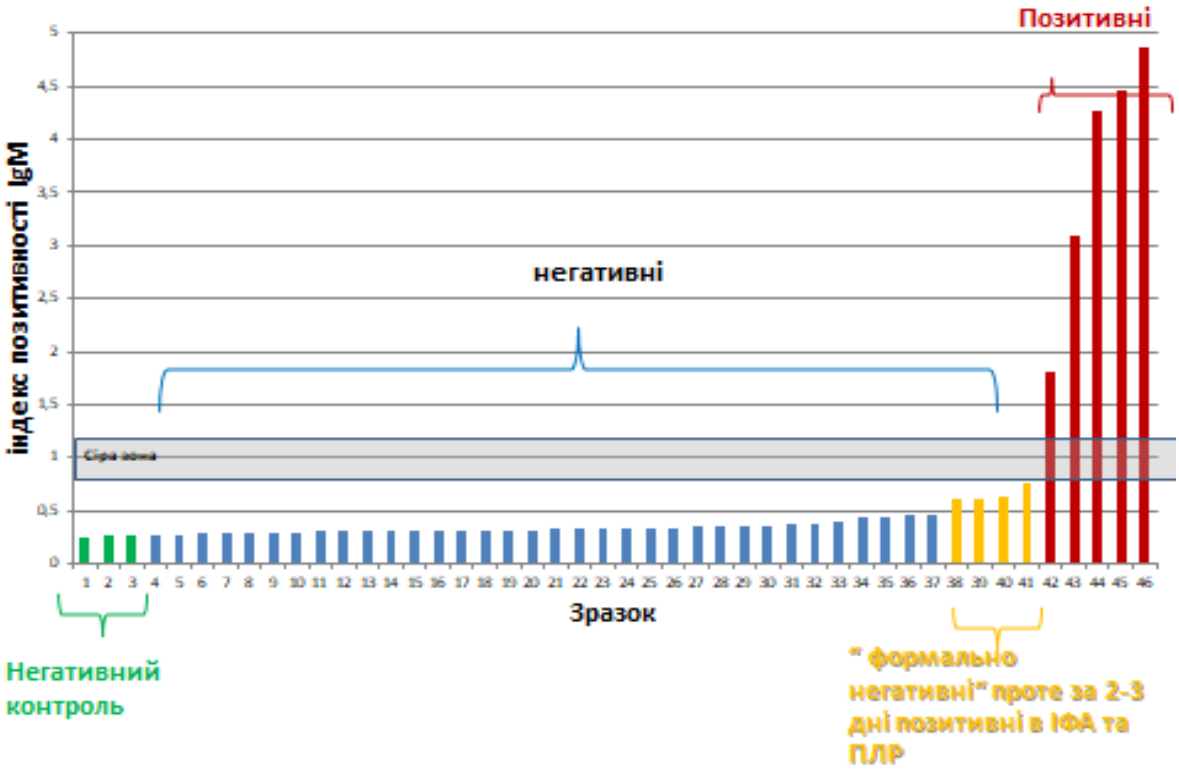


Рисунок 2.4 – Індекси позитивності імуноглобуліну М у обстежених пацієнтів, що перенесли коронавірусну інфекцію.

Ці дані співпадають з дослідженнями проведеними серед медичних працівників (рис 2.5), чітко візуалізується 4 субпозитивні результати 3 з яких у подальшому мали зростання рівнів IgG та IgM, один не досліджувався бо же наступного дня виявився ПЛР+. А та В приклади зростання рівні антитіл у 2 медпрацівників, що інфікувалися одночасно і були обстежені на антитіла IgM на 3-4 день після імовірного інфікування (день 0) та повторно за 3 дні (день 3).

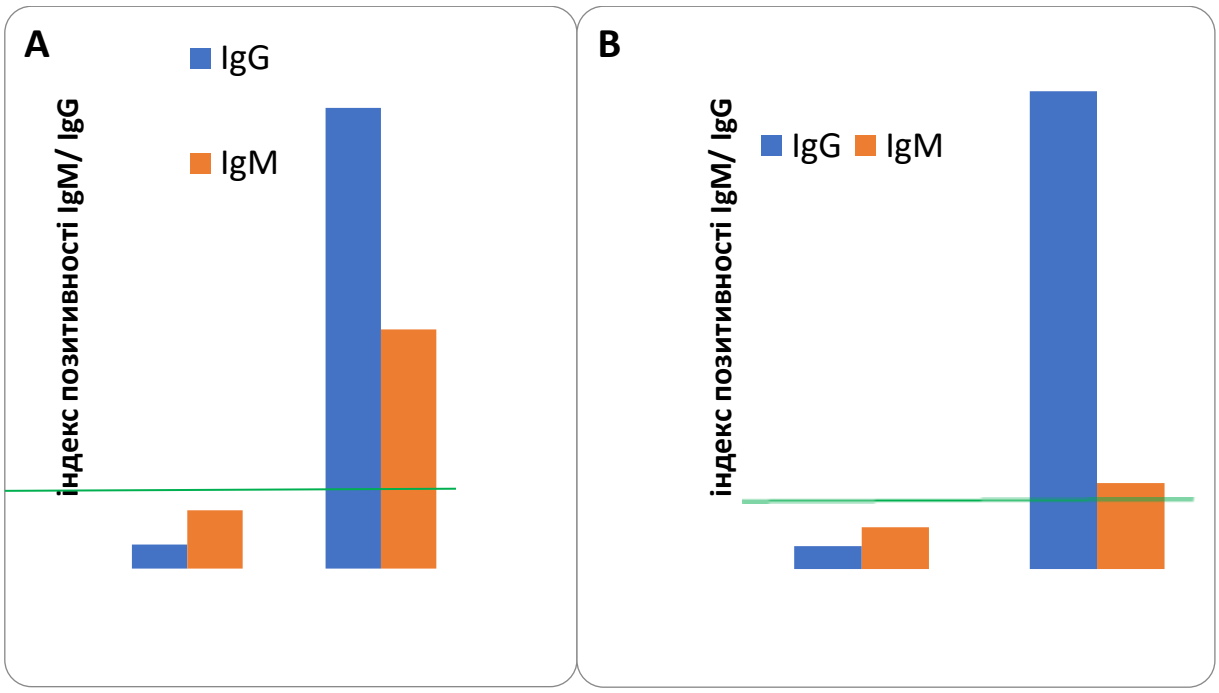


Рисунок 2.5 - Результати визначення антитіл IgM до коронавірусу у медичних працівників (приклад за 16.10.2020).

Дослідження динаміки хворих із позитивним ПЛР тестом дозволив виявити низку випадків що не вписуються у класичне розуміння антитілопродукції. Так був описаний випадок коли антитіла IgG у позитивному рівні були виявлені лише на 14 день після початку клінічних ознак а IgM так і не був виявлений а ні на 5, 8 та 14 день. Також був описаний випадок коли людина що перехворіла не мала позитивного рівня IgG та IgM і мала лише позитивний рівень IgA.

Позитивні рівні IgM не означають свіжу інфекцію і можуть триматися місяцями навіть без присутності IgG. Субпозитивні рівні IgM без позитиву за IgG із задовільною імовірністю дозволяють прогнозувати коронавірусне інфікування. Спектр антитіл що продукуються у відповідь на коронавірусну інфекцію часто індивідуальний і не завжди вкладається у класичну схему переключення класів імуноглобулінів.

Визначення рівня цитокінів у сироватці крові показало, що жінки із важким перебігом коронавірусної інфекції мали збільшений рівень секреторного IL-2 рецептору та знижений рівень IL-8 порівняно із контрольною групою (рис. 2.6, 2.7).

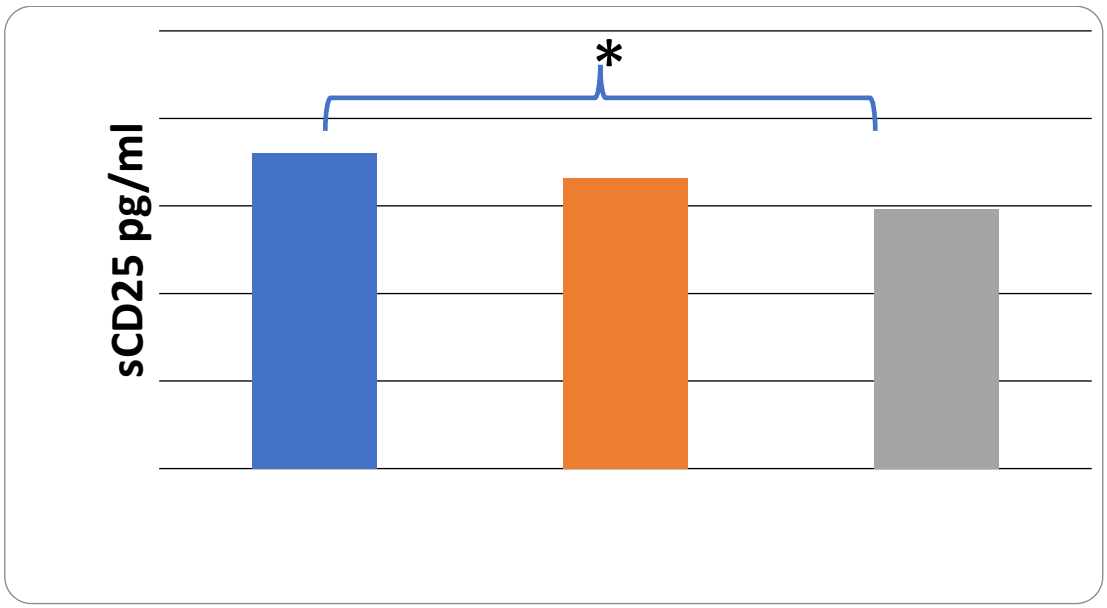


Рисунок 2.6 - Сироваткові рівні розчинного рецептору до інтерлейкіну-2, у жінок (sCD25R), * p<0,05.

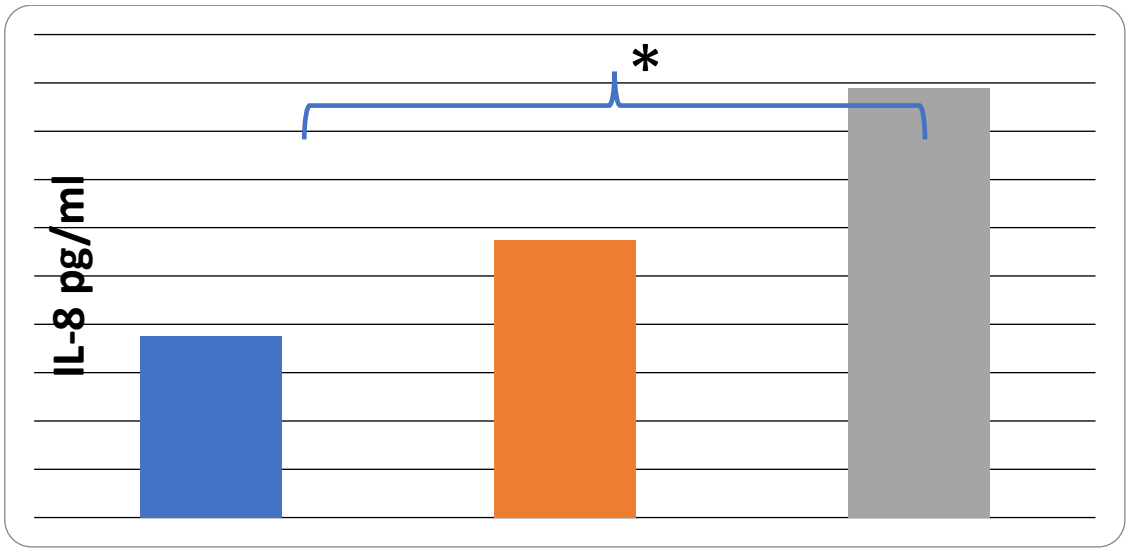


Рисунок 2.7 - Сироваткові рівні інтерлейкіну-8 (IL-8), у жінок, * p<0,05.

Визначення рівня цитокінів (рис. 2.8, 2.9) у сироватці крові показало, що діти із важким перебігом та середнім ступенем важкості захворювання мали збільшений рівень секреторного IL-2 рецептору та знижений рівень IL-8 порівняно із контрольною групою, що спостерігалось і у жінок (рис. 2.6, 2.7).

Діти із важким перебігом інфекції та середньою важкістю мали збільшений рівень секреторного IL-2 рецептору (sCD25) порівняно із контрольною групою (рис. 2.8).

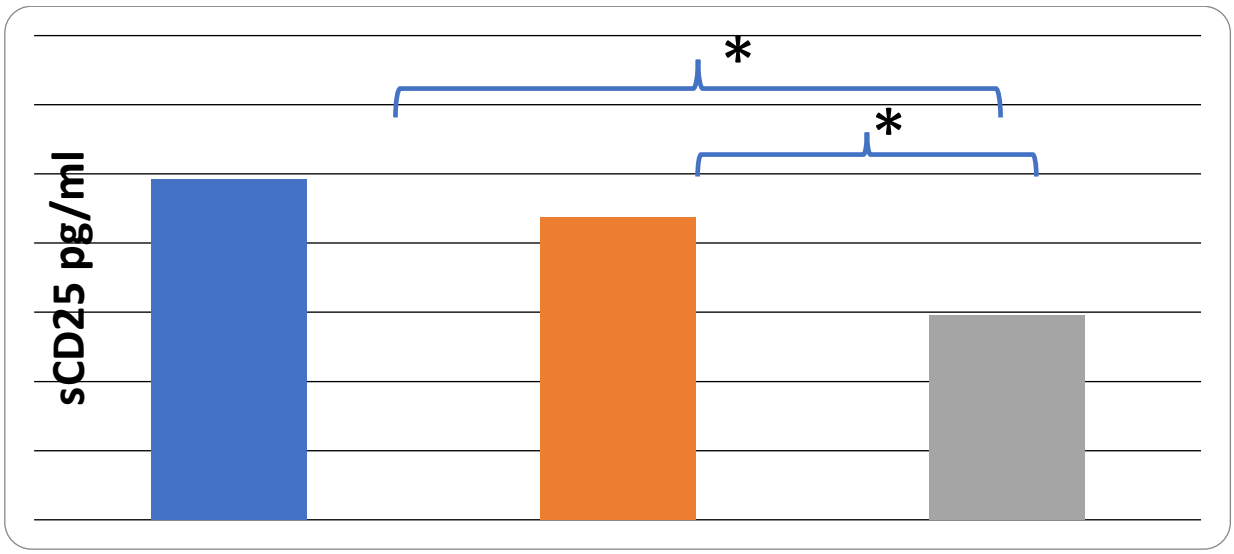


Рисунок 2.8 - Сироваткові рівні розчинного рецептору до інтерлейкіну-2 у дітей (sCD25R), * p<0,05.

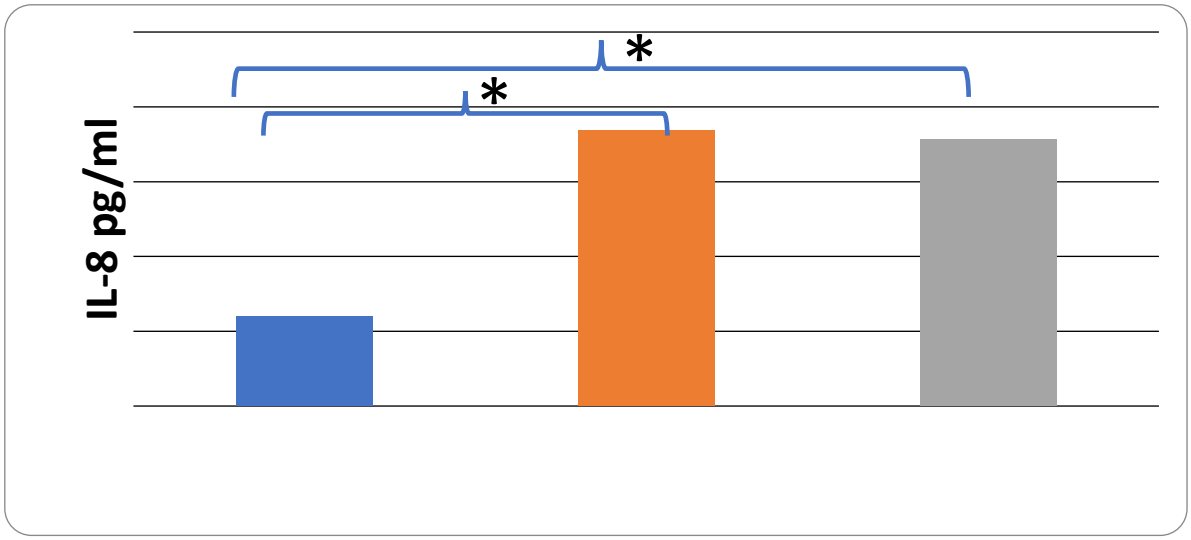


Рисунок 2.9 - Сироваткові рівні розчинного рецептору до інтерлейкіну-8 у дітей (sCD25R), * p<0,05.

Діти із важким перебігом інфекції мали знижений рівень IL-8 порівняно із середньою важкістю та контрольною групою (рис. 2.9).

В обох групах пацієнтів спостерігалося зниження рівня інтерлейкіну-8 у пацієнтів із важким перебігом, що може бути наслідком реципрокного супресування після неконтрольованої секреції таким собі виснаженням. Проте у дітей із середньою важкістю захворювання інтерлейкіну-8 був такий самий як у контрольній групі.

Зовсім інша картина спостерігається із рівнями секреторного рецептору до інтерлейкіну-2. Його рівні у жінок із важким перебігом збільшені порівняно із контрольною групою. У дітей цей рівень зростає із ступенем важкості і збільшений в обох групах порівняно із контрольною. Скидання рецептору до інтерлейкіну-2 є компенсаторною захисною реакцією організму на запалення що знижує здатність клітин до про-запальної активації та одночасно блокує активність IL-2 в сироватці крові, що в результаті знижує каскад активації Т клітин. Було виявлено, що у дітей злущування рецептору до IL-2 видувається активніше і це може пояснювати порівняно кращий перебіг захворювання.

Дослідження авідністі та вмісту антифосфоліпідних антитіл не виявили достовірних відмінностей у авідності антитіл до короновірусних протеїнів. Проведені дослідження не виявили змін між жінками та дітьми, та між пацієнтами із важким та середнім ступенем перебігу хвороби. Також не було виявлено різниці у рівнях та частоті присутності антифосфоліпідних антитіл. У переважної частини хворих авідність була нижчою ніж у пацієнтів, що перехворіли більше 3-х місяців тому.

2.1.5 Дослідження обміну вітаміну D в організмі дітей та жінок, що перенесли коронавірусне інфікування

Проведені дослідження щодо обміну вітаміну D в організмі жінок (табл. 2.15) показали, що середня концентрація вітаміну Д в сироватці крові жінок, що перенесли коронавірусне інфікування становила (53,9±21,1) нмоль/л. За світовими класифікаціями статусу вітаміну D в організмі такий показник розглядається як недостатність вітаміну D в організмі (25-72,5) нмоль/л. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування у віці до 30 років середня концентрація вітаміну D становила (56,5±24,7) нмоль/л, у жінок після 30 років середня концентрація вітаміну Д становила (51,7±18,2) нмоль/л.

Таблиця 2.15 - Середня концентрація вітаміну D в сироватці крові жінок, що перенесли коронавірусне інфікування

Показник концентрації вітаміну D	Група обстежених жінок			
	Всі жінки, (n=13)	Жінки віком до 30 років, (n=6)	Жінки віком після 30 років, (n=7)	ВШ(95%,ДІ)
Середня концентрація вітаміну D у жінок, (нмоль/л)	53,9±21,1	56,5±24,7	51,7±18,2	1.091 (0.081-14.665)

Показники концентрації вітаміну D у жінок різних вікових груп (табл.. 2.15) також вказували на недостатність вітаміну D в організмі обстежених жінок, що зазнали коронавірусного інфікування. Концентрація вітаміну D у жінок, що перенесли коронавірусну хворобу в залежності від його змін представлені на рисунку 2.10.

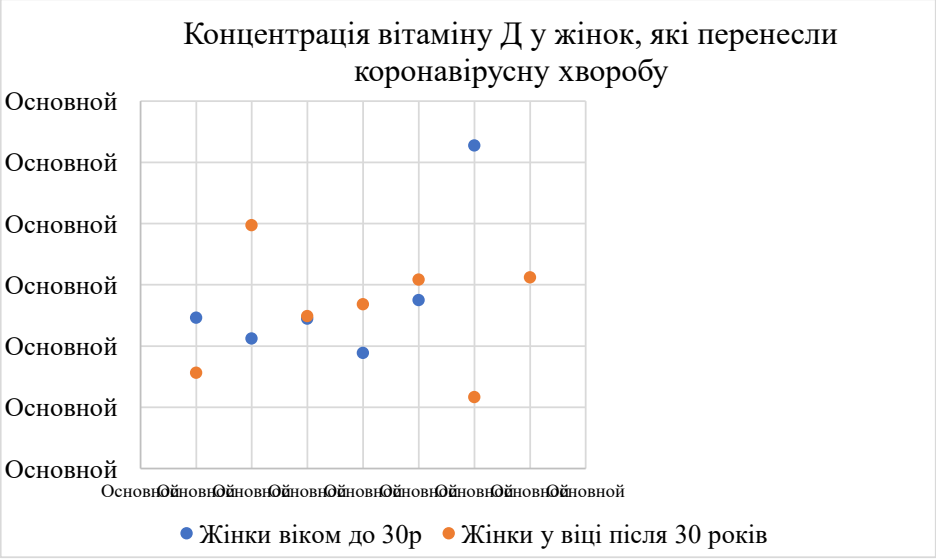


Рисунок 2.10 - Концентрація вітаміну D у жінок, що перенесли коронавірусну хворобу.

Серед обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування у однієї жінки після 30 років визначався дефіцит вітаміну D, а у шести жінок визначалася недостатність вітаміну D. У п’яти жінок віком до 30 років визначалась недостатність вітаміну D.

Проведені дослідження щодо обміну вітаміну D в організмі дітей (табл. 2.16) показали, що середня концентрація вітаміну D в сироватці крові дітей, що перенесли коронавірусне інфікування становила 57,6±29,6 нмоль/л. За світовими класифікаціями статусу вітаміну D в організмі такий показник розглядається як недостатність вітаміну D в організмі (25-72,5 нмоль/л). У обстежених дітей, що перенесли коронавірусне інфікування у віці до 16 років середня концентрація вітаміну D становила 55,1±25,4 нмоль/л, у дітей після 16 років середня концентрація вітаміну D становила 60,0±34,0 нмоль/л.

Таблиця 2.16 - Середня концентрація вітаміну Д в сироватці крові дітей, що перенесли коронавірусне інфікування

Показник концентрації вітаміну D	Група обстежених дітей			
	Всі дитини, (n=21)	Діти у віці до 16 років, (n=11)	Діти у віці після 16 років, (n=10)	ВШ (95 %, ДІ)
Середня концентрація вітаміну D у дітей (нмоль/л)	57,6±29,6	55,1±25,4	60,0±34,0	0.947 (0.076-11.871)

Показники концентрації вітаміну D у дітей різних вікових груп (табл.. 2.16) також вказували на недостатність вітаміну D в організмі обстежених дітей, що зазнали коронавірусного інфікування. Концентрація вітаміну D у дітей, що перенесли коронавірусну хворобу в залежності від його змін представлені на рисунку 2.11.

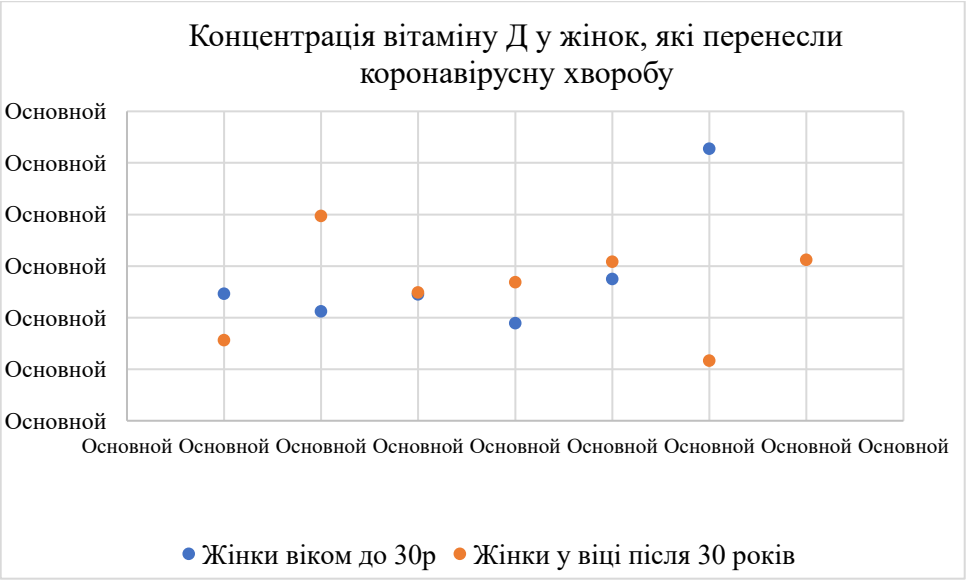


Рисунок 2.11 – Концентрація вітаміну D у дітей, що перенесли коронавірусну хворобу

2.1.6 Визначення вмісту креатинкінази в організмі дітей та жінок, що перенесли коронавірусне інфікування

Показники креатинкінази у жінок, які хворіли на коронавірусну інфекцію були підвищеними. Середнє значення показника криатинкінази у таких жінок становив (177,9±42,0) Е/л. У жінок віком до 30 років середнє значення цього показника також було підвищено і становило (172,3±35,1) Е/л. У жінок в віці після 30 років середнє значення показника креатинкінази було підвищеним і становило (182,7±49,4) Е/л (табл. 2.17).

Таблиця 2.17 - Середня концентрація креатинкінази у жінок, що перенесли коронавірусне інфікування

Показник концентрація креатинкінази	Група обстежених жінок			
	Всі жінки, (n=13)	Жінки віком до 30 років, (n=6)	Жінки віком після 30 років, (n=7)	ВШ (95 %, ДІ)
Середня концентрація креатинкінази у жінок (Е/л)	177,9±42,0	172,3±35,1	182,7±49,4	0.593 (0.088-3.981)

Підвищені показники креатинкінази виявлялись у 5 жінок у віковій групі до 30 років та у 4 жінок у віковій групі після 30 років (рис. 2.12).

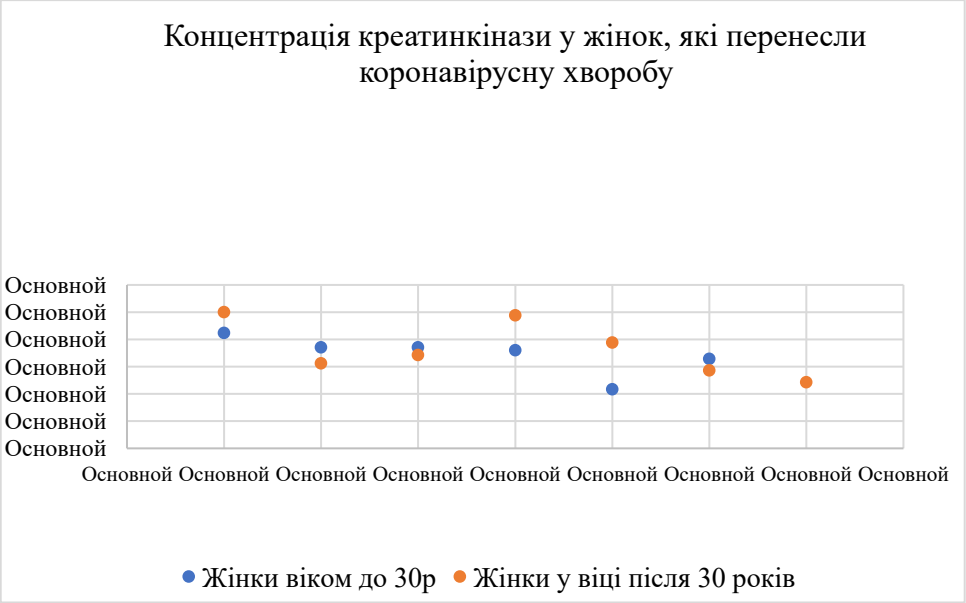


Рисунок 2.12 – Концентрація креатинкінази у жінок, які перенесли коронавірусне інфікування.

Показники креатинкінази у дітей, які хворіли на коронавірусну інфекцію були підвищеними. Середнє значення показника криатинкінази у таких дітей становив (199,1±67,3) Е/л. У дітей віком до 16 років середнє значення цього показника також було підвищено і становило (225,0±83,1) Е/л. У дітей в віці після 16 років середнє значення показника креатинкінази було підвищеним і становило (175,6±39,9) Е/л (табл. 2.18).

Таблиця 2.18 - Середня концентрація креатинкінази у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування

Показник концентрації креатинкінази	Група обстежених дітей			
	Всі дитини, (n=21)	Діти у віці до 16 років, (n=11)	Діти у віці після 16 років, (n=10)	ВШ (95 %, ДІ)
Середня концентрація креатинкінази у дітей (Е/л)	199,1±67,3	225,0±83,1	175,6±39,9	0.450 (0.025-8.027)

Концентрація креатинкінази у дітей, які перенесли коронавірусне інфікування представлено на рисутнку 2.13.

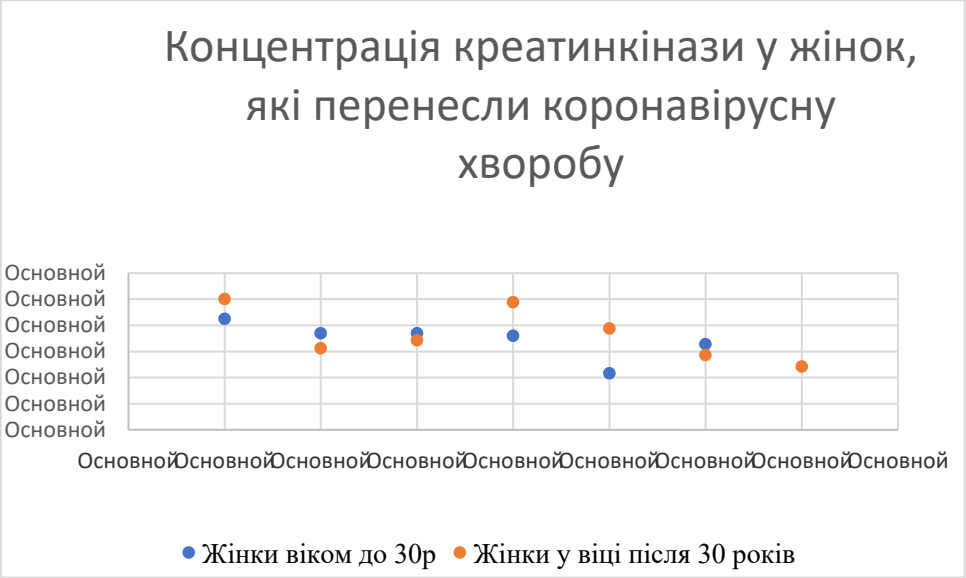


Рисунок 2.13 – Концентрація креатинкінази у дітей, які перенесли коронавірусне інфікування

Отримані результати визначення концентрації креатинкінази у дітей показали, що підвищені показники креатинкінази у обстежених дітей, що перенесли коронавірусне інфікування були більш вираженими ніж у жінок.

2.2 Результати досліджень та їх обговорення І етапу виконання проєкту в 2021 року

2.2.1 Аналіз статистичних даних щодо захворюваності на коронавірусну інфекцію у 2020 році та в першому кварталі 2021 року у різних областях України

2.2.1.1 Соціально-економічна характеристика декотрих областей України з високою поширеністю SARS-Cov2 інфекції

За даними офіційної статистики нами були обрані області з найвищою захворюваністю на SARS-Cov2, також при виборі областей України, що ввійшли до аналізу соціально-економічної характеристики, було враховано і географічне

розташування областей України (захід, схід, південь, центр та північ). Зокрема Аналіз статистичних даних щодо захворюваності на коронавірусну інфекцію у 2020 році та в першому кварталі 2021 року був проведений - в західних областях України з найвищою захворюваністю: Чернівеціка, Львівська та Тернопільська області, в Миколаївській області (південь України), в Харківській області (схід України), Київській області (північ України) та місці Києві (центр України). Дані про соціально-економічну характеристику декотрих областей України з високою поширеністю SARS-Cov2 інфекції представлені в додатку 3, том ІІ.

2.2.1.2 Оцінка можливостей системи охорони здоров’я надання допомоги щодо протидії поширенню та боротьбі із наслідками коронавірусної хвороби в регіонах України

Для оцінки можливостей системи охорони здоров’я надання допомоги щодо протидії поширенню та боротьбі із наслідками коронавірусної хвороби в регіонах України була розроблена спеціальна формула. Запропонована формула визначає відношення основних ланок процесу надання медичної допомоги, а саме чисельність працюючих лікарів, розмір середньої заробітної плати лікаря, вартість використання медичного обладнання та ліків, видатки на охорону здоров’я до виробничих можливостей окремого регіону або держави в цілому. Розроблена формула та її пояснення представлені в додатку 4, том ІІ.

В процесі створення формули були проаналізовані дані офіційної статистики про адміністративний поділ та населення всіх областей України (табл. 2.19). Дані офіційної статистики про адміністративний поділ та населення всіх областей України, стан епідеміологічної характеристики областей України за захворюваністю на COVID-19 та особливості фінансування закладів охорони здоров'я по областям України представлені в додатку 4, том ІІ.

Відповідно до статистичних даних найбільшим за щільністю населення в Україні є місто Київ (табл. 2.19), що пояснюється рівнем заробітних плат, рівнем економічного розвитку та розташуванням офісів основних роботодавців.

Також в Україні існують агломерації з підвищеною густотою населення, а саме Донецька область – щільність населення 163,8 чол/км^2, Львівська область – 116,3 чол/км^2. Меншою за густотою населення є агломерація Харківської області – 87,10 чол/км^2 та Одеської області – 71,9 чол/км^2. Важливо відмітити, що не дивлячись на меншу, у порівнянні з наведеними вище агломераціями, чисельність населення регіону у Чернівецькій області щільність населення майже відповідає Львівській області -112,20 чол/км^2.

Регіоном з найбільшою кількістю підтверджених випадків COVID-19 за 2020 рік (табл. 2.20) було місто Київ (111471,00 випадків), відповідно до даних офіційної статистики, а регіоном із найменшою кількістю виявлених випадків були Луганська (10508,00 випадків) та Кіровоградська (8448,00 випадків) області. Найбільш високий показник смертності від коронавірусної хвороби реєструвався у Львівській області (1771,00 випадків), а найменший у Кіровоградській області (253,00). Нами були проаналізовані показники коефіцієнтів кореляції Пірсона, щодо залежності кількості зареєстрованих випадків коронавірусної хвороби, показника смертності від цієї хвороби та чисельності і щільності населення регіонів України. Найбільший коефіцієнт кореляції 0.87 ми отримали при порівнянні показників захворюваності та смертності від коронавірусної інфекції, цей показник є важливим у оцінці ризиків, пов`язаних із поширенням коронавірусної інфекції. Другим, за значимістю, був показник коефіцієнта кореляції Пірсона між кількістю зареєстрованих випадків та щільністю населення регіонів України, від становив 0.67, тобто цей показник був наближений до значення високого ступеню зв`язку але не виходив за норми, що відповідають зв`язку середнього рівня. Таке значення коефіцієнту кореляції можна пояснити декількома факторами, серед яких досі не з`ясованим з технічних причин, є превалювання штамів COVID-19 у тому чи іншому регіоні за досліджуваний проміжок часу. Зв`язок між кількістю смертельних випадків від COVID-19 та щільністю населення також відповідав

середньому ступеню зв`язку, але був меншим у порівнянні із коефіцієнтом кореляції між кількістю зареєстрованих випадків та щільністю населення і становив – 0,59.

З відкритих джерел нами був проаналізований розмір субвенції, виділений центральними органами влади для областей України (таб. 2.21), значення показника розміру субвенції по областях мало середню ступень кореляційного взаємозв'язку з кількістю населення – коефіцієнт кореляції Пірсона 0,53, і слабкий ступінь зв'язку з щільністю населення України - коефіцієнт кореляції Пірсона 0,35. Завдяки використанню наведених обрахунків нами було визначено необхідну частину валового регіонального продукту, яка в умовах децентралізації має витрачатись на охорону здоров'я задля протидії поширенню коронавірусної інфекції серед населення України.

2.2.1.3 Вивчення поширеності коронавірусного (SARS-CoV2) інфікування серед жінок репродуктивного віку

На підставі даних «Центру громадського здоров'я МОЗ України», «Державного центру статистики України», Департаменту охорони здоров'я виконавчого органу Київської міської ради, ДУ «Чернівецькій обласний лабораторний центр МОЗ України», ДУ «Львівський обласний лабораторний центр МОЗ України», ДУ «Тернопільський обласний лабораторний центр МОЗ України» та ДУ «Миколаївський обласний лабораторний центр МОЗ України» був проведений аналіз поширеності коронавірусного (SARS-Cov2) інфікування серед жінок репродуктивного віку. Результати статистичного та математичного обрахування вивчення поширеності коронавірусного (SARS-CoV2) інфікування серед жінок репродуктивного віку, представлені у вигляді таблиць в додатку 5, том II.

Вивчення поширеності інфікування на SARS-Cov2 серед жінок репродуктивного віку в Україні показало, що дана категорія склала 0,7 % за 2020

рік та 0,3 % за І квартал 2021 року. Найбільша поширеність хвороби COVID-19 серед жінок репродуктивного віку в 2020 році спостерігалась в Чернівецькій (1373.93) області, м. Києві (1249.86), Рівненській (1114.44), Сумській (1104.73) та Київській (1031.58) областях, а найменша - в Луганській (133.87), Донецькій (233.31) та Кіровоградській (233.52) областях. Згідно офіційним даним за І квартал 2021 року лідерами за поширеністю були Чернівецька (749.78), Івано-Франківська (621.22), Житомирська (484.30), Вінницька (442.88), Закарпатська (431.21) області та м. Київ (304.98), а найменшу поширеність мали - Луганська (59.01), Кіровоградська (64.20) та Донецька (82.46) області.

2.2.1.4 Вивчення поширеності коронавірусного (SARS-Cov2) інфікування серед дітей України

Серед населення України діти, у яких зареєстрована SARS-Cov2 інфекція, склали 0,12 % за 2020 рік та 0,05 % за 1 квартал 2021 року, а поширеність на 100000 дитячого населення визначено як 688.64 та 259.82 відповідно. Серед дитячого населення відсоток зареєстрованих випадків SARS-Cov 2 інфекції у дітей склав 0,7 % за 2020 рік та 0,3 % за 1 квартал 2021 року. Результати статистичного та математичного обрахування вивчення поширеності коронавірусного (SARS-CoV2) інфікування серед дітей, представлені у вигляді таблиць в додатку 6, том ІІ.

2.2.2 Генетичні предиктори в організмі жінок і дітей з коронавірусним інфікуванням, які можуть бути діагностичними критеріями прогнозу поширення і перебігу коронавірусної інфекції для попередньої оцінки ступеня тяжкості перебігу коронавірусної інфекції

Аналіз поліморфізму I/D в гені ACE1 в контрольній групі показав, що поліморфізм I/D в гені *ACE1* полягає в наявності (I – Insertion, 490 п.н.), або

відсутності (D- Ddeletion, 203 п.н.) фрагмента розміром 287 нуклеотидів в 16-му інтроні гена *ACE*. Результати аналізу даного поліморфізму наведено на рисунку 2.20.

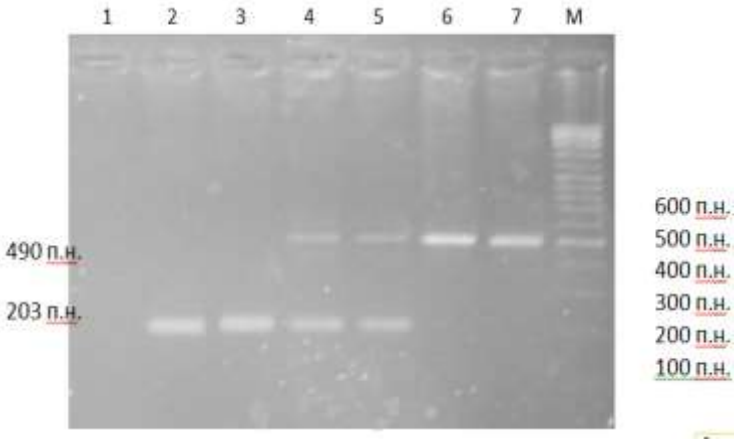


Рисунок 2.20 - Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР продукту гена ACE (I/D) в 2 % агарозному гелі: доріжка № 1 – негативний контроль, № 2,3 – II, № 4,5 – I/D, № 6,7 – DD, M – маркер молекулярної маси (Ladder 100 b.p.).

Аналіз алельних варіантів за поліморфізмом ACE1 I/D проводили в групі 100 осіб з різних регіонів України (середній вік 35 років, 50 – чоловіків, 50 – жінок). Розподіл генотипів та алельних варіантів досліджуваного поліморфізму наведено в таблиці 2.49.

Таблиця 2.49 - Розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму I/D в гені ACE1 в контрольній групі здорових індивідів з України

Локус ACE I/D	Контрольна група, (n=100)
Генотипи, n (%)	
II	18(0,18)
ID	51(0,51)
DD	31(0,31)
Алелі	
I	0,435
D	0,565

Для аналізу взаємозв'язку зустрічальності генотипу II з випадками захворюваності та смертності від COVID-19 на 1 млн. населення в Україні та деяких країнах Європи, з раніше опублікованих джерел було зібрано дані про розповсюдженість генотипу II за поліморфізмом *ACE1* I/D (табл. 2.50).

По кожній країні Європи задля узгодження даних, показники захворюваності та смертності були взяти за різні періоди пандемії COVID-19, а саме коли визначалися піки захворюваності на коронавірусну хворобу у кожній країні та коли рівень тестування з використанням RT-ПЛР тестувань сягав 100 на 1 тис. населення, для України це період з 01.02.21-01.05.21, а для таких країн як Угорщина, Польща, Словаччина, Франція, Італія, Іспанія, Велика Британія, Нідерланди, Швеція, Данія, Португалія, Швейцарія, Бельгія, Німеччина період з 23.03.20-23.05.20 відповідно.

Таблиця 2.50 - Частоти генотипу II та показники захворюваності та смертності від COVID-19

Країни	Кількість обстежених	ACE 1 I/I (%)	Covid-19 випадки	Випадок/ попул (n/mill)	Смерт-ність	Смертей/ попул (n/mill)
1	2	3	4	5	6	7
Україна	100	18	388715	471	21676	2,67
Угорщина	120	27	3741	386	482	50
Польща	632	29	29392	774	1247	33
Словаччина	209	25	1548	284	284	5
Швеція	59	27	33188	3307	3992	398
Данія	199	23	11487	1990	561	97
Швейцарія	199	25	31117	3631	1938	226
Велика Британія	386	21,2	258504	3828	36757	544
Нідерланди	61	20	45265	2648	5830	341
Бельгія	109	19	56810	4923	9237	800

Продовженн табл. 2.50

1	2	3	4	5	6	7
Німеччина	172	20,1	179986	2155	8261	99
Франція	450	17,6	182036	2795	28218	433
Іспанія	266	15	235290	5034	28678	614
Італія	468	16,6	229327	3787	32735	541
Португалія	510	16	36690	3569	1517	148

В той час як найнижчий показник відмічався в популяції Іспанії 15 %. З іншого боку, в цій же популяції спостерігали найвищий показник захворюваності 5034 на 1 млн. населення, а найнижчий показник захворюваності спостерігався у Словаччини 284 на 1 млн. населення. Важливо зазначити в популяції Словаччини, частота генотипу II, є однією з найвищих в групі досліджуваних країн Європи і складала 25 %, в той же час серед населення Бельгії, де частота генотипу II, складає 19 %, можна відмітити найвищі показники смертності від COVID-19. Найнижчі показники смертності від COVID-19 спостерігали серед населення України де частота генотипу II складає 18 %, при цьому захворюваність в даній популяції складає 471 на 1 млн населення.

Аналіз кореляції між показниками захворюваності та смертності на 1 млн населення і частотою генотипа II гена ACE1 з використанням рангової кореляції Спірмена.

На підтвердження нашої гіпотези про можливу протективну роль носійства генотипа II при зараженні SARS-CoV-2 та при перебігу захворювання на COVID-19 нами було проведено аналіз кореляції між показниками захворюваності та смертності на 1 млн населення і частотою генотипа II гена *ACE1*.

Кореляцію між захворюваністю на COVID-19 (рис. 2.21), смертністю від даного захворювання (рис. 2.22) та поширеністю генотипа II гена ACE1 в досліджуваних популяціях, оцінювали з використання коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (R). За результатами розрахунку даного показника (R) для захворюваності було визначено, статистично вірогідну, від'ємну кореляцію між

захворюваністю та поширеністю генотипа II (R= -0,53, p<0,05), така ж тенденція спостерігалася для взаємозв'язку між смертності від COVID-19 та поширеності генотипа II в популяціях, проте значення коефіцієнту кореляції (R= -0,47, p=0,09) не є статистично достовірним.

Наявність генотипу II може впливати на захворюваність та клінічний перебіг COVID-19, подібні закономірності були зазначені в дослідженнях інших авторів стосовно населення країн Європи та Близького Сходу, в ході даного дослідження також було встановлено, що населення цих країн має більш високу вірогідність щодо сприятливості інфікування SARS-CoV-2 у порівнянні з населенням країн Азії. Необхідно зазначити отримані нами результати, стосовно асоціації між частотою генотипу II та захворюваністю на COVID-19, співпадають з закономірностями отриманими у дослідженнях авторів. Про те щодо взаємозв'язку між смертністю від COVID-19, та носійством генотипу II, нами не було встановлено статистично вірогідної залежності для населення України, сусідніх прикордонних держав – Польщі, Словаччині, Угорщині та проаналізованих нами інших країн Європи (Швеція, Данія, Бельгія, Італія, Іспанія, Франція, Швейцарія, Нідерланди, Португалія, Німеччина, Велика Британія).

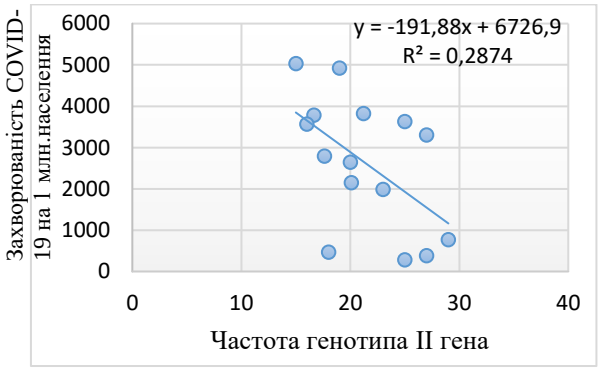


Рисунок 2.21 - Графік залежності між захворюваністю COVID-19 та частотою поширеності генотипа II гена ACE1 (%) в Україні та досліджуваних країнах Європи.

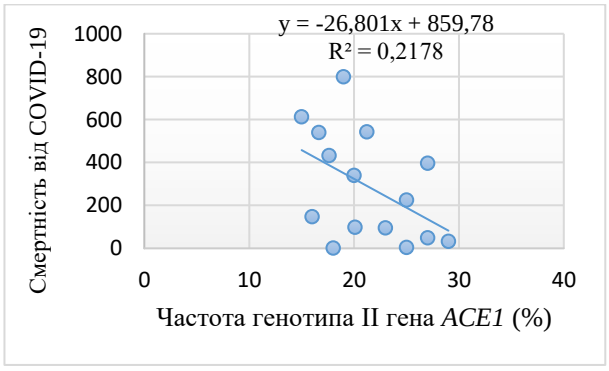


Рисунок 2.22 - Графік залежності між смертністю від COVID-19 та частотою поширеності генотипа II гена *ACE1* (%) в Україні та досліджуваних країнах Європи.

Виявлені відмінності між показниками захворюваності та смертності від COVID-19 в різних країнах Європи і особливо у порівнянні з жителями країн Азії, можна пояснити як соціокультурними відмінностями у поведінці населення під час пандемії, так і різницею у протиепідемічних заходах та рівні надання медичної допомоги. Проте, виявлені нами та іншими авторами асоціації між поширеністю різних генотипів за поліморфізмом *ACE1* I/D та показниками захворюваності, смертності від COVID-19, дають підстави вважати, що поліморфізм *ACE1* I/D може бути інформативним генетичним маркером прогнозу поширеності SARS-CoV-2 в популяції, з іншого боку отримані раніше в чисельних дослідженнях дані про асоціацію алельного поліморфізму *ACE1* I/D з кардіоваскулярними захворюваннями, запальними та імунними процесами, відкривають перспективи для досліджень його, як маркера прогнозу тяжкості перебігу захворювання на COVID-19. В ході досліджень інших генів, продукти яких залучені до патогенності SARS-CoV-2: ACE2b CTSL, TMPRSS, були отримані суперечливі результати, щодо їх асоціації з рівнем захворюваності, тяжкістю перебігу та смертністю від COVID-19.

Для створення робочо-діагностичної методики для генотипування за поліморфізмом I/D гена ACE1 людини були сформульовані завдання для даної роботи: виділити та очистити препарати геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові здорових індивідів. Отримати референсні зразки ДНК з різними генотипами з використанням методу ПЛР, з детекцією в кінцевій точці та подальшою візуалізацією продуктів ПЛР, шляхом електрофоретичного фракціонування в 1 % агарозному гелі з інтеркалюючим барвником бромистим етидієм та візуалізацією на УФ-трансілюмінаторі. Розробити дизайн олігонуклеотидних праймерів для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу. Оптимізувати реакційну суміш для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу. Відпрацювати температурно-часові режими, для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу. Проаналізувати патерн кривих плавління після проведення ПЛР на ДНК матриці референсних зразків з різними генотипами. Провести генотипування

на вибірці з 20 зразків ДНК, визначити генотипи за характером кривих плавління та незалежно валідувати з використанням стандартного методу.

Для визначення референсних зразків ДНК з різними генотипами за алельним поліморфізмом I/D у 16-му інтроні гена *ACE1* проводили аналіз продуктів специфічної ПЛР з детекцією в кінцевій точці.

Було проведено hot-start ПЛР, з початковою етапом hot-start впродовж 3 хв. при 94 градусах, а потім 35 циклів денатурації (1 хв, 94 град), відпалу (64 град 1 хв) і елонгації (72 град 1 хв). Після чого проводилася фінальна екстинкція впродовж 2 хвилин при температурі 72 град.

Отримані амплікони далі розділяли методом гель-електрофорезу в агарозному гелі з використтанням інтеркалюючого барвника бромистого етидія (рис. 2.23). Розділення відбувалося впродовж 35 хвилин при напрузі 260 В та силі струму 400 А. Референсом виступав маркер молекулярної маси 100-1000 2-log DNA Ladder від Thermo Fisher з кроком 100 п.н.

За результатом електрофорезу було відібрано зразки з усіма варіантами генотипів: ID, II, DD, які в подальшому можна було використовувати як референсні для розробки методу детекції в режимі реального часу.

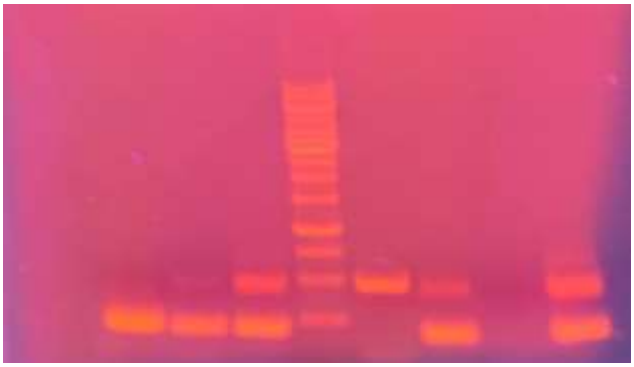


Рисунок 2.23 - Результати електрофоретичного розділення продуктів ПЛР, отриманих з референсних зразків.

Отримані референсні використовували як ДНК матрицю для проведення монохромного ПЛР в реальному часі. В даному випадку інтеркалюючим агентом виступав барвник Eva Green. При використанні почтакового протоколу ПЛР не вдалося отримати бажану ефективність реакції (рис. 2.24). Тому він був

модифікований з подовженням етапів hot-start і елонгації, на 8 хвилин а температуру відпалу було підвищено на 1 градус, що сприяло більшій ефективності реакції. (рис. 2.25) Тому після оптимізації був запропонований наступний температурний режим після оптимізації було підібрано наступний температурний режим: 1. 12 хв. денатурація при 95℃; 2. 1 хв. денатурація при 95℃; 3. 1 хв. відпал при 65℃; 4. 1 хв. елонгація при 72℃; 5. Повторення циклу (2-4) 40 разів; 6. 10 хв. елонгація при 72℃;

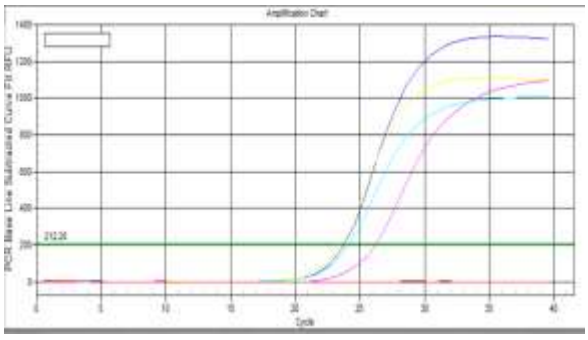


Рисунок 2.24 - Результати при проведенні ПЛР з використанням стандартного протоколу.

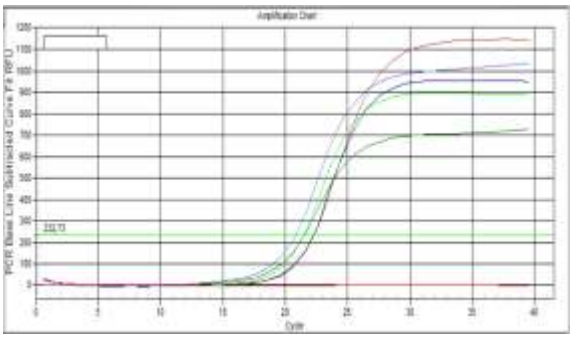


Рисунок 2.25 - Результати при проведенні ПЛР з модифікованим протоколом.

Після проведення монохромної ПЛР в реальному часі було проведено аналіз кривих плавління, з використанням барвника Eva Green. Заміри проводилися за наступним температурним режимом: початкова температура 55℃, підвищуючи до 95℃, з кроком 0.5℃ кожні 5 секунд. За результатами аналізу в програмному забезпеченні було побудовано графік залежності інтенсивності флуорисценції від температури, а також графік похідної від інтенсивності флуорисценції до тепмператури для різних генотипів за поліморфізмом гена *ACE1* (рис. 2.26, 2.27, 2.28). За результатами було виявлено два типи кривих, що відповідали алелям попередньо визначених референсних зразків.

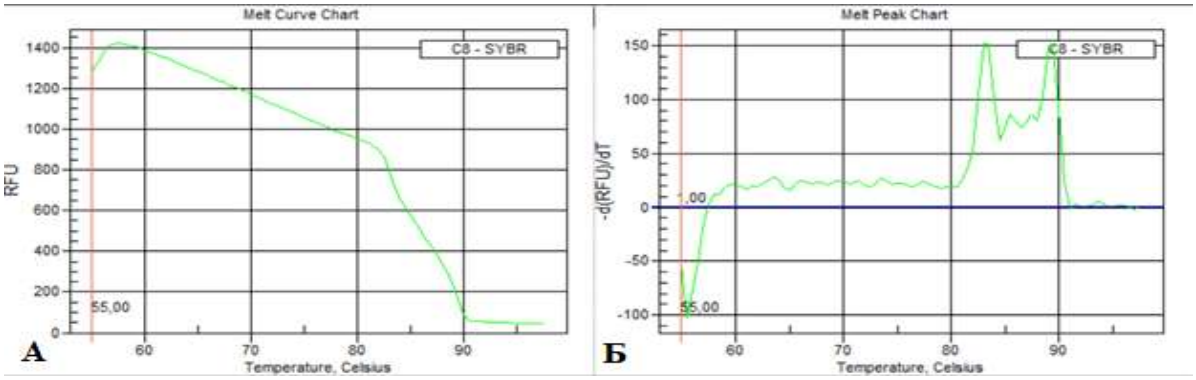


Рисунок 2.26 - Гетерозигота ID (А) залежність інтенсивності флуорисценції від температури, Б) залежність інтенсивності від температури).

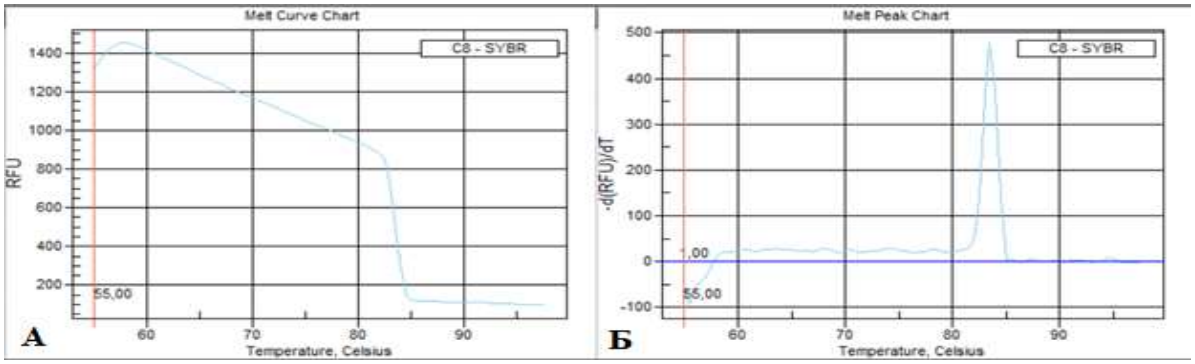


Рисунок 2.27 - Генотип DD. (А) залежність інтенсивності флуорисценції від температури Б) залежність інтенсивності від температури.

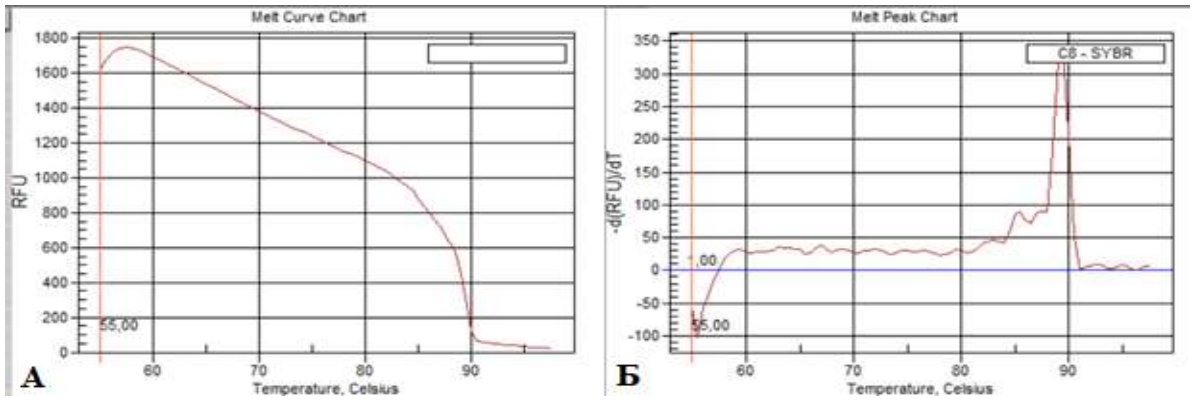
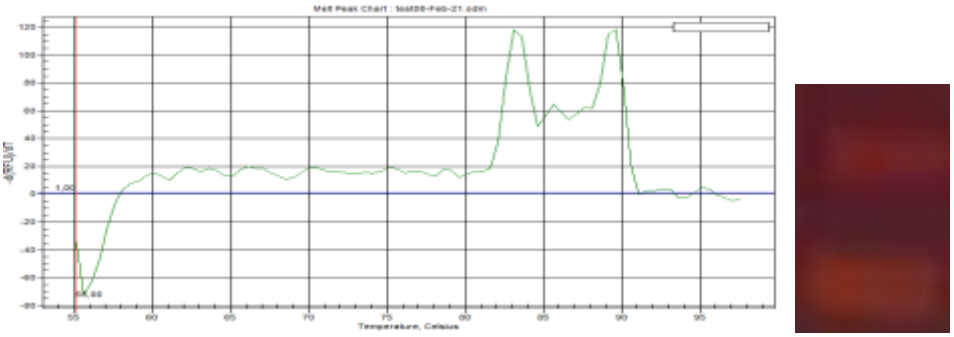


Рисунок 2.28 - Генотип II (А) залежність інтенсивності флуорисценції від температури Б) залежність інтенсивності від температури.

Розроблену методику було застосовано для генотипування на вибірці з 20-и зразків лейкоцитарної ДНК. А потім було валідовано шляхом використання незалежного методу ПЛР в кінцевій точці з подальшою візуалізацією шляхом

розділення в агарозному гелі з використанням гель електрофорезу та УФ-Візуалізацією. Зразок такої валідації представлено на рисунку 2.29.



а б

Рисунок 2.29 - а) результат з використанням аналізу кривих плавління б) результат з використанням методу ПЛР в кінцевій точці з подальшою візуалізацією шляхом розділення в агарозному гелі з використанням гель електрофорезу та УФ-Візуалізацією.

Генотипування в групі жінок та дітей з різним клінічним перебігом захворювання на COVID-19 за поліморфізмом I/D гена ACE1

За результатами генотипування в групі обстежуваних дітей були виявлені всі варіанти генотипів за поліморфізмом I/D гена ACE1: DD – гомозигота за делецією; ID – гетерозигота, II – гомозигота за інсерцією. Розподіл генотипів та частоти алелів наведено в таблиці 2.51.

Таблиця 2.51 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів I/D гена ACE1 у групи обстеження I.

Локус ACE, I/D	Група I, (n=70)
Генотипи, n (%)	
II	21 (0,3)
ID	28 (0,4)
DD	21 (0,3)
Алелі	
I	0,500
D	0,500

Найбільш розповсюдженим виявився гетерозиготний генотип (40 %) в той час як генотип гомозиготи за делецією (30 %) та інсерцією (30 %) зустрічалися з однаковою частотою. За клінічними ознаками ця група була розподілена на дві підгрупи; діти у яких захворювання протікало без ускладнень та діти у яких спостерігали ускладнення (легкі інтерстеціальні зміни в тканинах легенів та пневмонія) (табл. 2.52).

Таблиця 2.52 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів I/D гена ACE1 в підгрупах дітей з різним перебігом захворювання на COVID-19

Локус ACE, I/D	Без ускладнень, (n=20)	Ускладнення в анамнезі, (n=50)
Генотипи, n (%)		
II	6 (0,3)	15 (0,3)
ID	7 (0,35)	21 (0,42)
DD	7 (0,35)	14 (0,28)
Алелі		
I	0,475	0,510
D	0,525	0,490

За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів не виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів DD (F_{ex} 0,38; P= 0,29; OR 0,72 CI 0,24-2,19) така ж закономірність спостерігалась щодо розподілу генотипів носіїв алеля D {DD+ID} (F_{ex}0,6; P=0,494; OR 1; CI 0,32-3,1) між підгрупами дітей з різним перебігом захворювання. Таким чином, не встановлено асоціації між генотипами за поліморфним локусом I/D гена *ACE1* та тяжкістю перебігу захворювання на COVID-19 в обстежуваній групі дітей. Такий результат пояснюється низьким рівнем експресії гена *ACE2* у дітей та, відповідно, відсутністю взаємозалежності між продукцією білків ACE1 та ACE2 у дітей.

За результатами генотипування в групі обстежуваних жінок були виявлені всі варіанти генотипів за поліморфізмом I/D гена ACE1, а також розраховано розподіл генотипів та частоти алелів, що наведено в таблиці 2.53.

Найбільш розповсюдженим виявився гомозиготний генотип DD (44 %) в той час як гетерозиготний генотип складав (25 %) та гомозиготний генотип за інерцією складав (31 %) від обстежуваної групи хворих.

Таблиця 2.53 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів I/D гена ACE1 у групи обстеження II

Локус ACE, I/D	Група II, (n=70)
Генотипи, n (%)	
II	22 (0,31)
ID	18 (0,253)
DD	31 (0,437)
Алелі	
I	0,443
D	0,557

Аналіз генотипів було проведено також в підгрупах жінок розбитих за перебігом захворювання на COVID-19 (табл. 2.54) і не було виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів DD (F_{ex} 0,38; P= 0,75; OR 0,85 CI 0,32-2,25) така ж закономірність спостерігалась щодо розподілу генотипів носіїв алеля D {DD+ID} (F_{ex}0,39; P=0,59; OR 0,74; CI 0,25-2,14) між підгрупами жінок з різним перебігом захворювання.

Таблиця 2.54 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів I/D гена *ACE1* в підгрупах жінок з різним перебігом захворювання на COVID-19.

Локус ACE, I/D	Без ускладнень, (n=26)	Ускладнення в анамнезі, (n=44)
Генотипи, n (%)		
II	7 (0,269)	15 (0,34)
ID	7 (0,269)	11 (0,25)
DD	12 (0,462)	18 (0,41)
Алелі		
I	0,404	0,466
D	0,596	0,534

Однак при порівнянні розподілу генотипів між підгрупою жінок, що захворіли на COVID-19 з ускладненнями в анамнезі та контрольною групою здорових індивідів з популяції України (табл. 2.55) виявлено статистично вірогідні відмінності між зустрічальністю носіїв алеля D в аналізованих групах (F_{ex}0,036; P=0,07; OR 0,44; CI 0,197-0,9797).

Таблиця 2.55 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів I/D гена *ACE1* в підгрупі жінок з ускладненнями в анамнезі захворювання на COVID-19 та контрольною групою індивідів.

Локус ACE, I/D	Контрольна група, (n=100)	Ускладнення в анамнезі, (n=44)
Генотипи, n (%)		
II	18(0,18)	15 (0,34)
ID+ DD	82(0,82)	29 (0,66)
Алелі		
I	0,435	0,466
D	0,565	0,534

Таким чином, можна зробити висновок про асоціацію між носійством алеля D та тяжким перебігом захворювання у жінок молодого віку. На основі отриманих даних аналізу алельних варіантів гена ACE1 можна сказати, що даний поліморфізм I/D може бути використаним в якості генетичного маркера тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 у жінок репродуктивного віку.

Дослідження асоціацій поліморфних варіантів - 174 G/C в гені IL6 та ss469415590 гена IFNL4, як важливих компонентів імунної відповіді, з тяжкістю перебігу захворювання на COVID-19 у дітей та жінок репродуктивного віку.

Аналіз поліморфізму генів IL6 та IFNL4 проводили методом ПЛР в реальному часі з використанням флуоресцентно мічених олігонуклеодитних зондів (TaqMan) (рис 2.30, та 2.31).

Генотипування в групі жінок та дітей з різним клінічним перебігом захворювання на COVID-19 за поліморфізмом -174 G/C гена IL6.

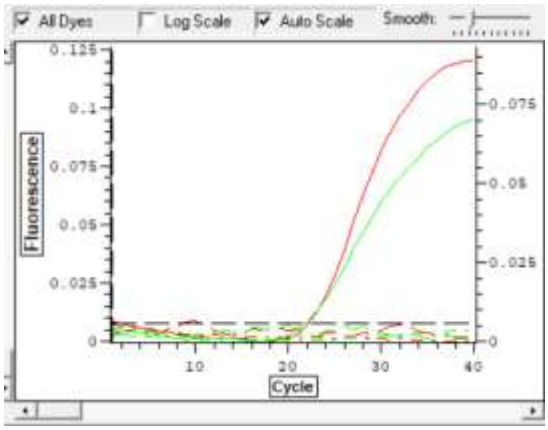


Рисунок 2.30 - Флуорограми ампліфікації послідовності генів *IL6* та *IFNL4* для виявлення поліморфізму методом використання флуоресцентно мічених зондів TaqMan (зелена фарба FAM – гомозигота за геном *IL6* та червона фарба VIC – гомозигота за геном *IFNL4*).

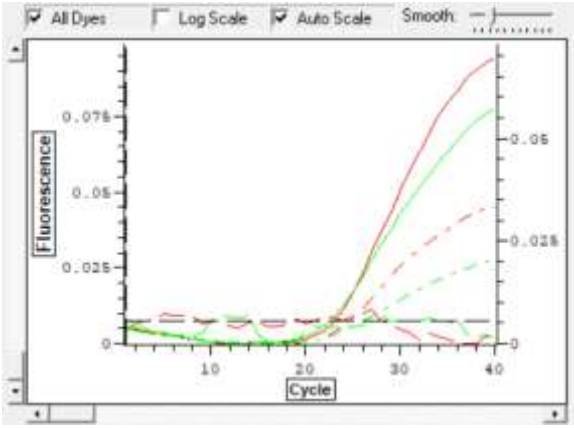


Рисунок 2.31 - Флуорограми ампліфікації послідовності генів *IL6* та *IFNL4* для виявлення поліморфізму методом використання флуоресцентно мічених зондів TaqMan (зелена фарба FAM – гетерозигота за геном *IL6* та червона фарба VIC – гетерозигота за геном *IFNL4*).

Результаті аналізу генотипів за поліморфізмом -174 G/C гена *IL6* у дітей наведено у таблиці 2.56, а результаті аналізу генотипів за поліморфізмом -174 G/C гена *IL6* у жінок репродуктивного віку наведено у таблиці 2.57.

Таблиця 2.56 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів -174 G/C гена *IL6* у групи обстеження I

Локус IL-6, -174 G/C	Група I, (n=70)
Генотипи, n (%)	
GG	28 (0,4)
GC	26 (0,37)
CC	16 (0,23)
Алелі	
G	0,586
C	0,414

Можна сказати, що за результатами генотипування у групи дітей виявлено мутантний генотип СС який зустрічався з частотою 23 %, тоді як гетерозиготний генотип зустрічався з частотою 37 %, а генотип GG з частотою 40 % (табл. 2.56).

Така ж тенденція спостерігалась і для частоти зустрічальності мінорного генотипу СС у жінок (17 %) в той час як зустрічальність індивідів з гетерозиготним генотипом GC (56 %) більш ніж вдвічі перевищувала долю гомозигот за алелем G (27 %), які характеризуються більш високою експресією IL-6 (табл. 2.57).

Таблиця 2.57 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів -174 G/C гена IL-6 у групи обстеження II

Локус IL-6, -174 G/C	Група II, (n=70)
Генотипи, n (%)	
GG	19 (0,27)
GC	39 (0,56)
CC	12 (0,17)
Алелі	
G	0,550
C	0,450

За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів не виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів СС гена *IL6* (F_{ex} 0,27; P= 0,19; OR 0,58; CI 0,18-1,9) така ж закономірність спостерігалась щодо розподілу генотипів носіїв алеля С {CC+GC} (F_{ex}0,2; P=0,15; OR 0,55; CI 0,18-1,65) між підгрупами дітей з різним перебігом захворювання (табл. 2.58).

Таблиця 2.58 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів -174 G/C гена IL-6 в підгрупах дітей з різним перебігом захворювання на COVID-19

Локус IL-6, -174 G/C	Без ускладнень, (n=20)	Ускладнення в анамнезі, (n=50)
1	2	3
Генотипи, n (%)		
GG	6 (0,3)	22 (0,44)
GC	8 (0,4)	18 (0,36)

Продовженн табл. 2.58

1	2	3
CC	6 (0,3)	10 (0,2)
Алелі		
G	0,500	0,620
C	0,500	0,380

За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів не виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів CC гена *IL6* (F_{ex} 0,52; P=0,39; OR 1,22; CI 0,33-4,54) така ж закономірність спостерігалась щодо розподілу генотипів носіїв алеля C {CC+GC} (F_{ex}0,09; P=0,06; OR 2,43; CI 0,82-7,1) між підгрупами жінок репродуктивного віку з різним перебігом захворювання (табл. 2.59).

Таким чином, не було встановлено асоціації між носійством алельних варіантів за поліморфним локусом -174 G/C гена *IL-6* ні у дітей, ні у жінок репродуктивного віку, які захворіли на COVID-19. Проте подальші дослідження з розширенням груп обстеження дозволять більш чітко проаналізувати подібні закономірності.

Таблиця 2.59 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів -174 G/C гена IL-6 в підгрупах жінок репродуктивного віку з різним перебігом захворювання на COVID-19

Локус IL6, -174 G/C	Без ускладнень, (n=26)	Ускладнення в анамнезі, (n=44)
Генотипи, n (%)		
GG	10 (0,39)	9 (0,21)
GC	12 (0,46)	27 (0,61)
CC	4 (0,15)	8 (0,18)
Алелі		
G	0,615	0,511
C	0,385	0,489

Результати аналізу генотипів за поліморфним локусом ss469415590 гена *IFNL4* в групі з 70 дітей, що хворіли на COVID-19, наведено в таблиці 2.39. Необхідно зазначити, що найбільш розповсюдженим був генотип TC гетерозиготи (49 %) за поліморфним локусом, в той час як гомозиготи за алелем Т зустрічалися рідше інших (13 %). Частота генотипа CC становила 39 % (табл. 2.60).

Таблиця 2.60 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів ss469415590 гена *IFNL4* у групи обстеження I

Локус IFNL4, ss469415590	Група I, (n=70)
1	2
Генотипи, n (%)	
TT	9 (0,128)
TC	34 (0,486)
CC	27 (0,386)
Алелі	
T	0,371
C	0,629

Результати аналізу генотипів за поліморфним локусом ss469415590 гена *IFNL4* в групі з 70 жінок, що хворіли на COVID-19, наведено в таблиці 2.61. Необхідно зазначити, що найбільш розповсюдженим був, як і в групі дітей, генотип TC (47 %). Рідше за все зустрічався гомозиготний генотип TT (14 %). Гомозиготний генотип CC відзначений майже у половини від усіх обстежених жінок – 49 %.

Таблиця 2.61 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів ss469415590 гена *IFNL4* у групи обстеження II

Локус *IFNL4*, ss469415590	Група II, (n=70)
1	2
Генотипи, n (%)	
TT	10 (0,143)
TC	33 (0,471)
CC	27 (0,386)

Продовження табл. 2.61

1	2
Алелі	
T	0,379
C	0,621

За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів не виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів, проте спостерігалась тенденція до зниження частки носіїв алеля T (TT+TC) – 54 % в групі пацієнтів з ускладненнями в анамнезі у порівнянні з часткою індивідів з такими ж генотипами в групі дітей без ускладнень – 80 % (табл. 2.62). Ця закономірність сягала статистичної значущості за критерієм Фішера, при цьому показник співвідношення шансів OR=0,3 (CI 0,086-1) також мав значущій довірчий інтервал.

Існують суттєві особливостей противірусної активності, викликаної інтерферонами III типу (λ). По-перше, на відміну від інтерферонів I типу, рецептори яких широко представлені практично у всіх соматичних клітинах, рецептори до інтерферонів III типу переважно знаходяться в негематологічних клітинах, особливо клітинах епітеліального походження, таких як бронхіальний епітелій, епітелій шлунково-кишкового тракту та кератиноцити.

Таблиця 2.62 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів ss469415590 гена IFNL4 в підгрупах дітей з різним перебігом захворювання на COVID-19

Локус *IFNL4*, ss469415590	Без ускладнень, (n=20)	Ускладнення в анамнезі, (n=50)
Генотипи, n (%)		
TT	4 (0,2)	5 (0,1)
TC	12 (0,6)	22 (0,44)
CC	4 (0,2)	23 (0,46)
Алелі		
T	0,500	0,320
C	0,500	0,680

По-друге, дослідження перебігу вірусних інфекцій на декількох мишачих моделях показали, що інтерферони III типу відіграють більш значну роль, ніж інтерферон I типу, як медіатори противірусного захисту від деяких типів вірусів, які переважно інфікують шлунково-кишковий тракт і/або епітелій дихальних шляхів.

Знижена частка дітей-носіїв протекторного алеля T який призводить до продукції інтерферону λ4, якраз і може бути причиною того, що в даній групі дітей індукується менша кількість інтерферону λ в не гематологічних клітинах і, зокрема, в клітинах бронхіального епітелію. Це, в свою чергу, може призводити до ураження легенів, що спостерігається в даній групі дітей.

За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів не виявлено статистично вірогідних відмінностей за розподілом генотипів CC гена *IFNL4* (F_{ex} 0,6; P=0,5; OR 0,99; CI 0,37-2,69) така ж закономірність спостерігалась щодо розподілу генотипів носіїв алеля C {CC+TC} (F_{ex}0,105; P=0,07; OR 0,33; CI 0,084-1,317) між підгрупами жінок репродуктивного віку з різним перебігом захворювання (табл. 2.63).

Таблиця 2.63 - Розподіл генотипів та поліморфних алелів ss469415590 гена *IFNL4* в підгрупах жінок репродуктивного віку з різним перебігом захворювання на COVID-19

Локус *IFNL4*, ss469415590	Без ускладнень, (n=26)	Ускладнення в анамнезі, (n=44)
Генотипи, n (%)		
TT	6 (0,231)	4 (0,091)
TC	10 (0,385)	23 (0,523)
CC	10 (0,385)	17 (0,386)
Алелі		
T	0,423	0,352
C	0,577	0,648

Не виявлено подібної тенденції у хворих жінок як у дітей, і це можна пояснити як різною локалізацією білків імунної системи у дітей так і різним рівнем

експресії білків імунної системи і, зокрема, рівнем продукції інтерферону λ4. Таким чином, поліморфізм ss469415590 гена *IFNL4*, може слугувати генетичним маркером спадкової схильності до тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 у дітей.

2.2.3 Визначення значення стану показників імунітету жінок та дітей після коронавірусного інфікування

Стан імунної системи має критичне значення у перебігу вірусних інфекцій і CoV19 зокрема.

Проведені імунологічні дослідження не виявили асоціації між продукцією автоімунних антитіл та перенесеною хворобою (імовірно тому що більшість мала легку форму). Рівні Т-клітин та баланс Т-хелперів /Т-цитотоксиків а також рівні маркеру активації на них був однаковий у контрольній та дослідній групах (імовірно тому що більшість мала легку форму). Популяція НК клітин у пацієнток після перенесення навіть легкої форми CoV19 була достовірно знижена порівняно із контрольною групою. Зниження НК популяції відбувалося переважно за рахунок НК клітин що експресували рецептор CD8aa. Рівні CD8aa негативних НК не знижувались. Експресія HLA-DR на НК клітинах пацієнток що перехворіли була збільшена. Популяція НКТ клітин (CD3+CD8+CD56+) у пацієнток що перехворіли також була достовірно знижена. Рівні цитотоксичої активності НК лімфоцитів у пацієнток після CoV19 біли достовірно знижені порівняно з контрольною групою. Безсимптомний та легкій перебіг інфекції CoV19 реалізується за рахунок напруження механізмів природньої резистентності та призводить до виснаження популяції НК та НКТ лімфоцитів та їх активності. Зниження ланки природньої резистентності призводить до формування стану високої чутливості до розвитку гострих інфекційних захворювань та реактивації хронічних. З іншого боку легкий перебіг не призводить до суттєвих змін у Т клітинній та гуморальній системах проте призводить до формування надійної специфічної імунореактивності до

CoV19. Рівні IgM у пацієнток що перехворіли у середній та важкій формах SarsCoV2 порівняно із тими хто мав легкий перебіг SARS-CoV-2 та не SARS-CoV-2 ГРВІ були достовірно збільшені. Рівні IgA та IgG не залежали від тяжкості перебігу.

Легкий перебіг CoV19 інфікування завершується ще до початку формування специфічної імунної відповіді у вигляді як гуморальної так і Т-клітинної тому ці ланки і не афетовані у цих пацієнтів. Натомість протягом цих 5-7 критичних днів для розвитку процесу, ключовою ланкою стають НК лімфоцити та інші фактори природньої резистентності. Саме ці ланки і виснажуються за легкої форми перебігу інфекційного процесу, що може створювати ризик для розвитку інших інфекційних процесів та загострення хронічних.

В процесі одужання в середньо-симптомному та важкому перебігу CoV19 важлива і навіть критична роль належить Т-клітинній ланці. Ми дослідили рівні Т-лімфоцитів CD3+ та рівні окремих популяцій Т-лімфоцитів (Т-хелперів CD3+CD4+ та Т-цитотоксичних CD3+CD8+).

Достовірної різниці в рінях Т лімфоцитів ми не виявили порівнюючи групу жінок, що перехворіли CoV19 у безсимптомній або легкій формі порівняно з контрольною групою жінок що не хворіли CoV19 (табл. 2.64).

Таблиця 2.64 - Рівні Т-клітин (CD3+) та субпопуляцій Т-хелперів (CD3+CD4+) та Т-супресорів (CD3+CD4+) у % від загальної кількості лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3+ лімфоцитів±SD	CD3+CD4+ лімфоцитів±SD	CD3+CD4+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	73,5±5,69	47,3±7,16	22,6±5,06
Не хворіли, (n=86)	73,7±5,05	47,0±7,11	23,2±5,80

Дослідження маркеру активації HLA-DR та KIR рецептору CD158a на Т-клітинах у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

Ми не виявили достовірного підвищення рівнів експресії маркеру активації HLA-DR на Т-клітинах та їх окремих популяціях між дослідницькою та контрольною групами (табл. 2.65).

Це може буди свідченням відсутності системного впливу легкої форми Cov19 на Т ланку. Також не було виявлено змін у експресії KIR рецептору на Т-клітинах, що також свідчить про відсутність системної мобілізації Т-клітин (табл. 2.65)

Таблиця 2.65 – Рівні експресії маркеру хронічної активації HLA-DR, KIR рецептору CD158 та адгезивного рецептору нервових клітин CD56 на Т-клітинах (CD3+) та % від загальної кількості Т-лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD	CD3+CD158+ лімфоцитів±SD	CD3+CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	12,8±6,11	5,5±6,99	5,2±5,38
Не хворіли, (n=86)	12,4±5,86	6,2±9,89	4,5±4,79

Дослідження маркеру активації HLA-DR на субпопопуляціях Т-клітин у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

Ми не виявили достовірного підвищення рівнів експресії маркеру активації HLA-DR як на Т-хелперах так і на Т-цитотоксичних лімфоцитах (табл. 2.66).

Це може буди свідченням відсутності системного впливу легкої форми CoV19 на Т ланку. Як на її регуляторний компонент так і на ефекторний. Причиною того є легка форма перебігу інфекції де весь активний процес закінчився ще до формування специфічної Т-клітинної відповіді (табл. 2.66).

Дослідження рівня НК клітин та їх фенотипу у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

НК клітини мають унікально-архаїчний спосіб розпізнавання пухлинних та вірус інфікованих клітин і не потребують попередньої сенсабілізації. Саме вони виконують реалізують первинну ланку захисту від вірних інфекцій поки формується специфічна гуморальна та клітинна імунна відповідь.

Таблиця 2.66 – Рівні експресії маркеру хронічної активації HLA-DR на Т-хелерах та Т-цитотоксичних лімфоцитах. % експресії в популяції у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3+CD4+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD	CD3+CD8+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	6,9±3,32	18,0±9,57
Не хворіли, (n=86)	7,5±4,72	17,4±10,99

Тобто у випадку безсимптомної та легкої форми CoV19 саме НК клітини зупиняють процес розповсюдження вірусного інфікування клітин та забезпечують безсимптомний перебіг. Високий рівень НК клітин та їх функціональної активності є важливим фактором резистентності до інфекцій.

Проведені дослідження виявили достовірне зниження рівня НК лімфоцитів у пацієнток, що перехворіли на CoV19 порівняно з контрольною групою (табл. 2.67).

Таблиця 2.67 – Рівні НК лімфоцитів (CD3-CD56+), % відносно загальної кількості лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3-CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	(11,3± 4,52)*
Не хворіли, (n=86)	13,1± 5,56
Примітка. *p<0,05 порівняно з контрольною групою (тих, що не хворіли)	

Експресія маркеру активації HLA-DR на НК клітинах пацієнток, що перехворіли на CoV19 була незначно збільшена (p=0,09 на НК клітинах, що свідчить про активну проліферацію задля компенсації зниженого рівня (табл. 2.68).

Таблиця 2.68 - Рівні експресії маркеру проліферації/активації HLA-DR на НК клітинах(CD3-CD56+) у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3-CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	(15,7±9,15)**
Не хворіли, (n=86)	13,7± 8,82
Примітка. **p<0,1 порівняно з контрольною групою (тих, що не хворіли)	

Зниження рівня НК клітин реалізується за рахунок НК, що експресують рецептор CD8aa (ко-рецептор для розпізнавання власних HLA молекул) тож зниження НК клітин спричинено саме активною участь у розпізнавання та зниженні вірус інфікованих клітин власного організму. Натомість неспеціалізовані НК клітини CD8aa- не знижуються після інфекційного процесу (табл. 2.69).

Таблиця 2.69 - Рівні експресії рецептору CD8aa на НК клітинах(CD3-CD56+) у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3-CD56+CD8aa+ лімфоцитів	CD3-CD56+CD8aa- лімфоцитів ±SD
Перехворіли, (n=66)	(5,0±2,32)*	6,5±3,29
Не хворіли, (n=86)	6,0 ±3,34	6,9±3,20
Примітка. *p=0,01 порівняно з контрольною групою (тих, що не хворіли)		

Подібно до НК клітин у пацієнток що перехворіли на CoV19 були знижені рівні НКТ (CD3+CD8+CD56+), ця популяція є дублюючою/резервною до НК лімфоцитів та забезпечує НК функцію у випадку виснаження популяції НК. Тож активна протидія вірусному інфікуванню призвела і до виснаження НКТ популяції навіть за легкого та безсимптомного перебігу хвороби (табл. 2.70).

У досліджених пацієнток із середньою тяжкістю перебігу CoV19 виражене зниження НК лімфоцитів спостерігалося у всіх.

Таблиця 2.70 - Рівні НКТ лімфоцитів (CD3+CD8+CD56+), % відносно загальної кількості лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група жінок	CD3+CD8+CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли, (n=66)	(15,3±9,17)*
Не хворіли, (n=86)	18,2±8,34
Примітка. *p=0,02 порівняно з контрольною групою (тих що не хворіли)	

Дослідження цитотоксичності природних кіллерів у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

Середні рівні цитотоксичності натуральних кіллерів в обох групах не відрізнялись достовірно. Проте пропорції тих хто мав високу та знижену активність достовірно відрізнялися. Серед тих хто перехворів, майже половина (48,1 %) мала низькі рівні НК цитотоксичної активності і лише 37 % пацієнток мала таку НКц у контрольній групі (рис. 2.32).

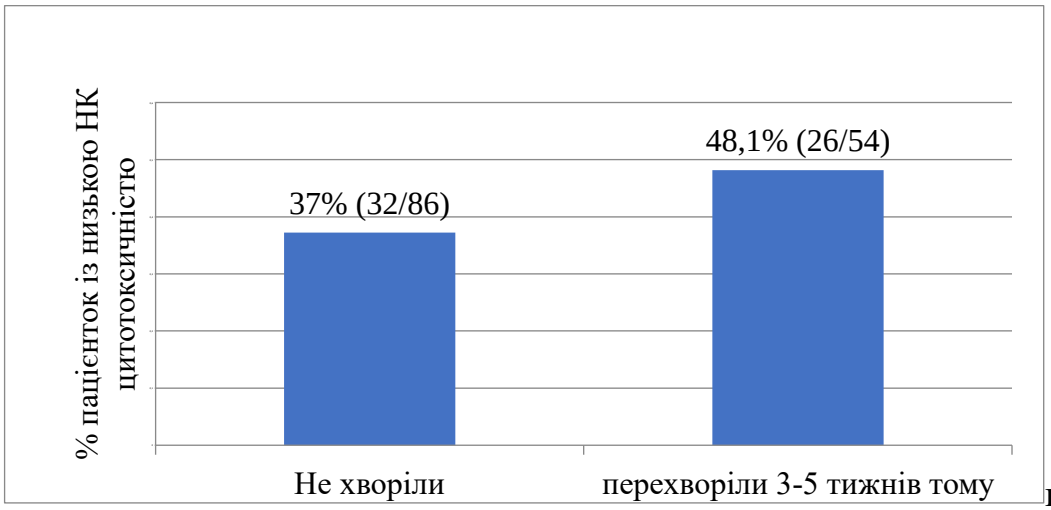


Рисунок 2.32 - Пропорція жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування із низькою НК цитотоксичністю (<30 % специфічного лізису пухлини К562 за співвідношення Ефектор/Мішень 20/1).

Випадково ми отримали результати щодо зміни рівня НК цитотоксичності після перенесеного безсимптомно чи малосимптомно SARS-CoV-2. 8 пацієнток

були обстежені на НК цитотоксичність у січні лютому як контрольні здорові в рамках спільного дослідження а Національним антарктичним центром. Під час обстеження у квітні вони були визначенні як позитивні на антитіла IgG до CoV19, в переважній більшості перебіг був безсимптомний. НК цитотоксичність знизилася у 7 з 8 пацієнток. У однієї пацієнтки НКц не змінилася з причини того що вона і була низькою (рис. 2.33). Таким чином було виявлено індивідуальні зміни НКц у пацієнток після SARS-CoV-2.

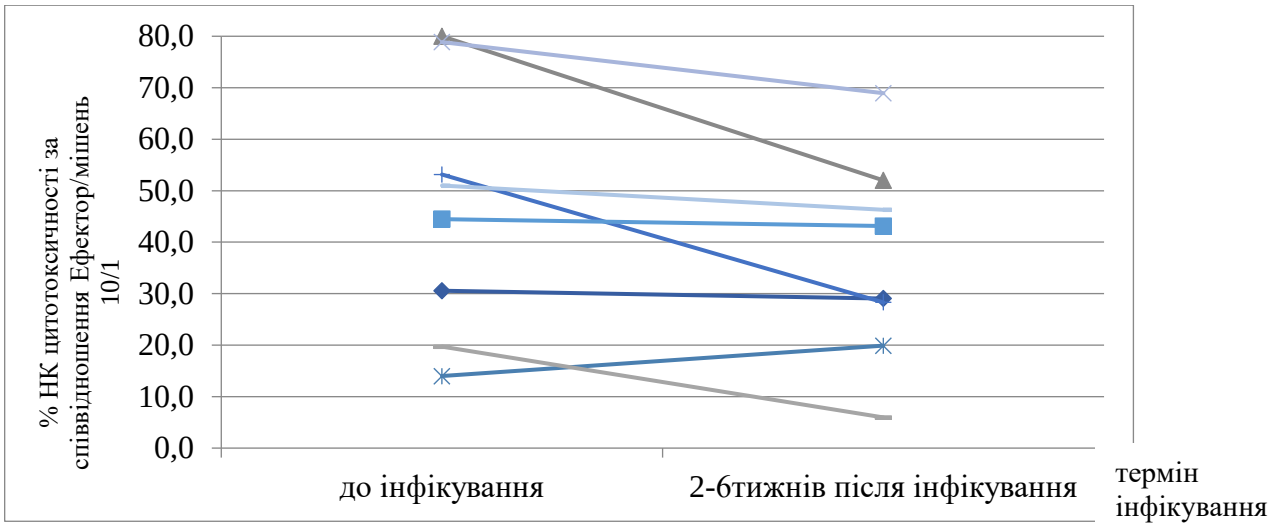


Рисунок 2.33 - Зміна у рівнях цитотоксичної активності НК лімфоцитів у жінок фертильного віку після перенесення SARS-Cov-2 інфекції.

Дослідження антифосфоліпідних антитіл у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

Проведені дослідження не виявили достовірного зростання рівнів антикардіоліпінових та антифосфотидилсеринових антитіл у пацієнток, що перехворіли на CoV19. Так само доля пацієнток із позитивними рівнями антифосфоліпідних антитіл була незначна і однакова в дослідницькій та контрольній групах. Імовірною причиною того є не важкий перебіг захворювання на коронавірусну інфекцію.

Дослідження антитіл до CoV19 у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування.

Проведені дослідження дозволили дослідили спектр специфічних антитіл до Cov19. У 92,4 % були виявлені позитивні рівні IgG у 49,8 % (147/159) позитивні

рівні IgM (79/159) та лише у 11,9 % позитивні рівні IgA (19/159).У дослідній групі IgM позитивність без позитивного рівня IgG була виявлена лише у 7,5 % пацієнток (12/159) (рис. 2.34).

У дослідній групі IgA позитивність без позитивного рівня IgG була виявлена лише у 0,6 % пацієнток (1/159) (рис 2.35).

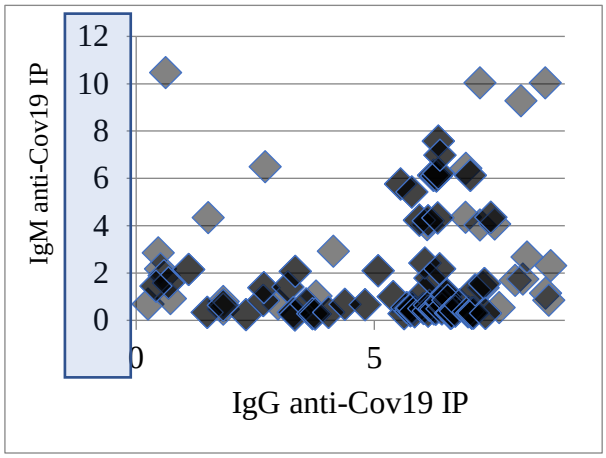


Рисунок 2.34 - Рівні IgG та IgM у групі жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування (IP –індекс позитивності).

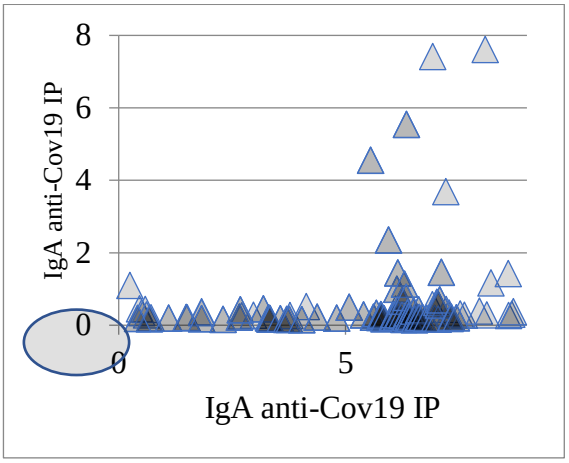


Рисунок 2.35 - Рівні IgG та IgA у групі жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування (IP–індекс позитивності).

Ця єдина пацієнтка що не мала антитіл окрім IgA лікувалася препаратом Мабтера® (Mabthera) 2 роки тому. Препарат є В-клітинним супресантом.

Були досліджені субпопуляції цієї пацієнтки і виявили виражений дефіцит В клітин у периферійній крові (<2%). Це пояснює відсутність гуморальної відповіді IgG та IgM. Проте В-клітини слизових дали гуморальну відповідь через продукцію IgA. Випадок потребує подальшого детального аналізу.

Таким чином, визначення сироваткових рівнів CoV19-специфічного IgA є малоінформативною лабораторною ознакою захворювання на CoV19 окрім унікальних випадків.

Порівняння рівнів специфічних антитіл до SARS-CoV-2 у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування із різним ступенем тяжкості перебігу SARS-CoV-2.

Рівні специфічних антитіл до SarsCoV2 (IgG IgM IgA) у пацієнток що мали середній та тяжкий перебіг інфекції не відрізнялись від рівнів антитіл у пацієнток що мали легкий перебіг. Тобто гуморальна відповідь в обох випадках формується і продукується високі концентрації специфічних антитіл (табл. 2.71).

Таблиця 2.71 - Рівні специфічних антитіл до SarsCoV2 у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від тяжкості перебігу захворювання,

г/л

Перебіг захворювання на коронавірусну інфекцію	IgG anti-CoV19	IgM anti-CoV19	IgA
Середній та тяжкий, (n=13)	5,78	2,34	0,45
Легкий, (n=39)	5,40	1,78	0,62

Також були досліджені про автоімунну ланку гуморальної відповіді та визначали рівні антифосфоліпідних антитіл (проти кардіоліпіну та фосфотидилсерину) у пацієнток із різною тяжкістю захворювання SarsCoV2. Рівні антифосфоліпідних антитіл в обох групах були однакові (табл. 2.72).

Таблиця 2.72 - Рівні специфічних антифосфоліпідних антитіл у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від тяжкості перебігу захворювання.

Перебіг захворювання на коронавірусну інфекцію	Анти кардіоліпінові IgG, GPL/ml	Анти фосфотидилсеринові IgG, U/ml
Середній та тяжкий, (n=13)	6,34	8,20
Легкий, (n=39)	4,53	8,76

При оцінці загального стану антитілопродукції було виявлене достовірне зростання рівнів IgM у пацієнток що перехворіли у середній та важкій формах SarsCoV2 порівняно із тими хто мав легкий перебіг (табл. 2.73).

Дослідження рівнів антитіл у ЖФВ, що мали легкий перебіг ГРВІ виявили такі самі рівні антитіл що у пацієнток з легким перебігом SARS-CoV-2. Рівні IgM у пацієнток, що перехворіли у середній та важкій формах SARS-CoV-2 порівняно із тими хто мав легкий перебіг не SARS-CoV-2 були так само достовірно збільшені. Тобто збільшення рівня IgM не є специфічною особливістю SARS-CoV-2, а є результатом важкого перебігу процесу.

Таблиця 2.73 - Рівні загальних сироваткових імуноглобулінів (IgG, IgM та IgA) у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від тяжкості перебігу захворювання,

г/л

Перебіг захворювання на коронавірусну інфекцію	IgG	IgM	IgA
Середній та важкий SARS-Cov-2, (n=13)	14,92	(1,82)*,**	3,06
Легкий SARS-Cov-2, (n=39)	14,05	1,55	3,13
Легкий перебіг ГРВІ (не SARS-Cov-2), (n=16)	13,22	1,53	3,19
Примітка. 1. *p=0,04 порівняно з групою пацієнток що мали легкий перебіг; 2. *p=0,03 порівняно з групою пацієнток що мали легкий перебіг ГРВІ (не SarsCov2)			

Таким чином пацієнтки отримали легкий перебіг Cov19 імовірно за рахунок активності НК та НКТ клітин, що призвело до виснаження цих популяцій (рис. 2.36). Їх виснаження знижує природню резистентність та підвищує чутливість до інших інфекційних агентів та імовірність реактивації хронічних інфекційних захворювань. Цей стан потребує подальшого коригування та вивчення.

Проте Т ланка не зазнала негативного впливу (рис. 2.37) інфекційного процесу, а специфічна гуморальна відповідь в такому варіанті перебігу сформувалася достатньо для запобігання повторному інфікуванню CoV2. Автоімунізації гуморальної ланки також не відбулося за рахунок легкого перебігу.

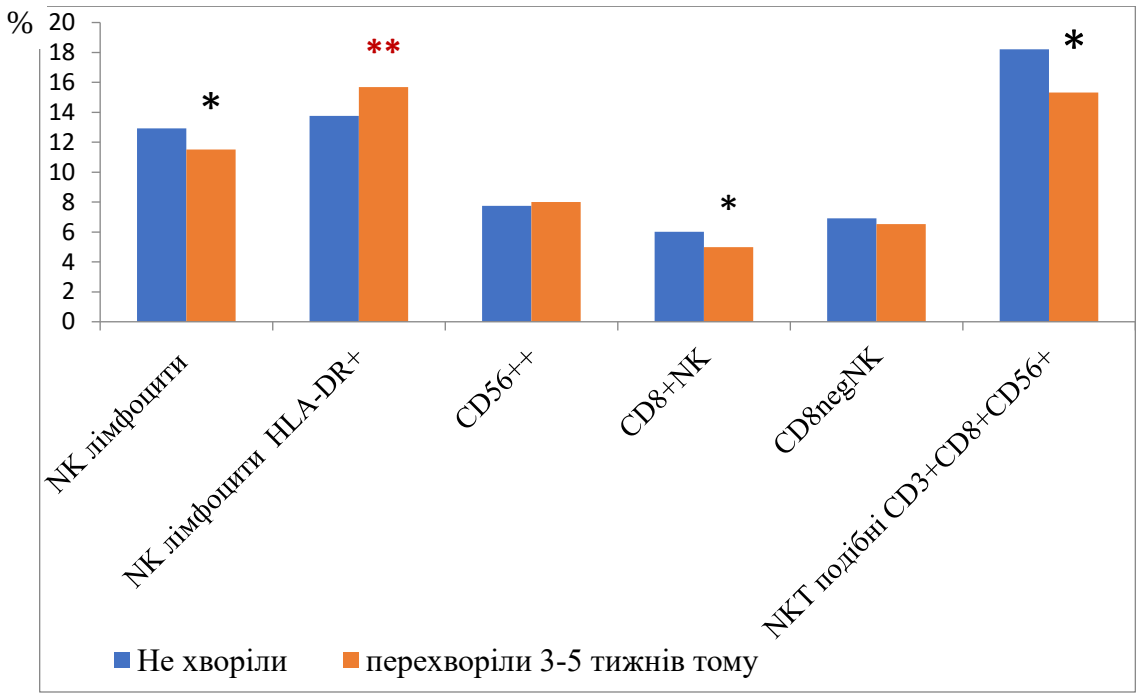


Рисунок 2.36 - Стан НК та НКТ лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування.

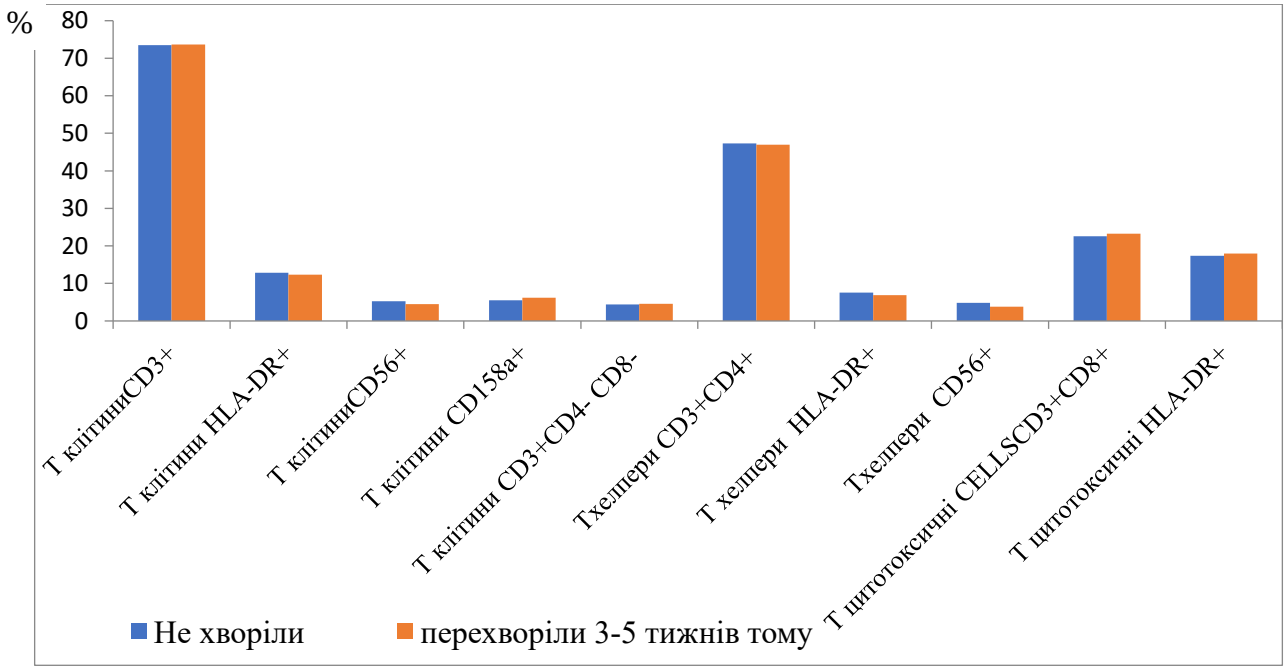


Рисунок 2.37 – Стан Т лімфоцитів у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування.

Результати проведених досліджень виявили, що гуморальна відповідь до CoV-2 формується за класичною схемою та рівні антитіл тримаються значний

проміжок часу, крім того, рівні антитіл через 240 днів вищі у пацієнтів, що мали важчий перебіг хвороби порівняно із легкими перебігом. Теж саме, було підтверджено у інших дослідженнях і показано, що рівень імунної пам'яті до CoV-2, як гуморальної, так і клітинної залишається високим протягом року (імовірно років) і формуються практично у всіх пацієнтів незалежно від важкості перебігу.

Дослідження Т-клітинної ланки імунної системи у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування показало, що в процесі одужання в середньо-симптомному та важкому перебігу Cov19 важлива і навіть критична роль належить Т клітинній ланці. Були досліджені рівні Т-лімфоцитів CD3+ та рівні окремих популяцій Т-лімфоцитів (Т-хелперів CD3+CD4+ та Т-цитотоксичних CD3+CD8+).

Достовірної різниці в рінях Т-лімфоцитів не виявили порівнюючи групу дітей, що перехворіли Cov19 у середній або легкій формі порівняно з контрольною групою дітей, що перехворіли на ГРВІ не Cov19 (табл. 2.74).

Таблиця 2.74 - Рівні Т клітин (CD3+) та субпопуляцій Т-хелперів (CD3+CD4+) та Т супресорів (CD3+CD4+) у % від загальної кількості лімфоцитів у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група дітей	CD3+ лімфоцитів±SD	CD3+CD4+ лімфоцитів±SD	CD3+CD8+ лімфоцитів±SD
Перехворіли (середній ступінь тяжкості) (n=6)	64,6±8,872631766	32,4±6,14	25,9±12,59
Перехворіли (легка форма) (n=10)	66,0±9,063482	36,6±6,87	19,8±4,04
Перехворіли на ГРВІ, (n=4) (середній ступінь тяжкості)	68,1±2,238805	38,1±5,15	21,4±3,50

Дослідження маркеру активації HLA-DR та KIRрецептору CD158a на Т-клітинах у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування. Не було виявлено достовірного підвищення рівнів експресії маркеру активації HLA-DR на Т клітинах

та їх окремих популяціях між дослідницькими та контрольною групами (табл. 2.75).

Таблиця 2.75 - Рівні експресії маркеру хронічної активації HLA-DR, KIR рецептору CD158 та адгезивного рецептору нервових клітин CD56 на Т клітинах (CD3+) та % від загальної кількості Т-лімфоцитів у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група дітей	CD3+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD	CD3+CD158+ лімфоцитів±SD	CD3+CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли (середній ступінь тяжкості) (n=6)	21,1±27,44	(26,6±23,22)*	(5,3±3,41)*
Перехворіли (легка форма) (n=10)	10,6±5,36	(8,0±4,08)*	(17,8±11,18)* **
Перехворіли на ГРВІ (середній ступінь тяжкості) (n=4)	12,4±6,65	4,4±2,15	1,9±0,88
Примітка. 1. *- p<0,05 порівняно з контрольною групою перехворіли на ГРВІ не SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості); 2. ** - p<0,05 порівняно з перехворіли SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості).			

Це може буди свідченням відсутності системного впливу легкої форми Cov19 на Т ланку. Проте було виявлено збільшення Т клітин що експресують KIR рецептор CD158 та НКТ подібних лімфоцитів у дітей, що мали короновірусну хворобу порівняно із тими, що мали ГРВІ не короновірусної природи (табл. 2.75).

Дослідження маркеру активації HLA-DR на субпопопуляціях Т-клітин у дітей, що перенесли SARS-CoV-2 (табл. 2.76).

Не виявило достовірного підвищення рівнів експресії маркеру активації HLA-DR як на Т-хелперах так і на Т-цитотоксичних лімфоцитах.

Таблиця 2.76 - Рівні експресії маркеру хронічної активації HLA-DR на Т хелерах та Т цитотоксичних лімфоцитах, % експресії в популяції у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група дітей	CD3+CD4+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD	CD3+CD8+ HLA-DR+ лімфоцитів±SD
Перехворіли (середній ступінь тяжкості) (n=6)	17,6±6,14	23,4±28,07
Перехворіли (легка форма) (n=10)	5,9±6,87	13,1±6,96
Перехворіли на ГРВІ (середній ступінь тяжкості) (n=4)	10,1±5,15	16,8±8,25

Це може буди свідченням відсутності системного впливу легкої та середньої форми Cov19 на Т ланку. Як на її регуляторний компонент так і на ефекторний. Причиною того є висока індивідуальна розбіжність в значеннях між різними пацієнтами (табл. 2.76). Дослідження рівня НК клітин та їх фенотипу у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування.

НК клітини мають унікально-архаїчний спосіб розпізнавання пухлинних та вірус інфікованих клітин і не потребують попередньої сенсабілізації. Саме вони виконують реалізують первинну ланку захисту від вірних інфекцій поки формується специфічна гуморальна та клітинна імунна відповідь. Тобто у випадку безсимптомної та легкої форми CoV19 саме НК клітини зупиняють процес розповсюдження вірусного інфікування клітин та забезпечують безсимптомний перебіг. Високий рівень НК клітин та їх функціональної активності є важливим фактором резистентності до інфекцій.

На відміну від дорослих пацієнтів не було виявлено достовірне зниження рівня НК лімфоцитів у дітей, що перехворіли на CoV19 порівняно з контрольною групою та в залежності від тяжкості перебігу (табл. 2.77). Імовірно дитяча імунна система має більшу можливість до відновлення НК ланки та легкий та середній ступінь не призводить до тривалої супресії НК лімфоцитів.

Таблиця 2.77 - Рівні НК лімфоцитів (CD3-CD56+), % відносно загальної кількості лімфоцитів у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група дітей	CD3-CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=6)	13,9±8,45
Перехворіли SARS-CoV-2 (легка форма) (n=10)	12,2±7,11
Перехворіли на ГРВІ не SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=4)	16,8±3,96

У дітей, що перехворіли на CoV19 були збільшені рівні НКТ (CD3+CD8+CD56+), ця популяція є дублюючою/резервною до НК лімфоцитів та забезпечує НК функцію у випадку виснаження популяції НК. Тож активна протидія вірусному інфікуванню призвела зростання НКТ популяції (табл. 2.78).

Таблиця 2.78 - Рівні НКТ лімфоцитів (CD3+CD8+CD56+), % відносно загальної кількості лімфоцитів у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

%

Група дітей	CD3+CD8+CD56+ лімфоцитів±SD
Перехворіли SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=6)	(8,3±4,56)*
Перехворіли SARS-CoV-2 (легка форма) (n=10)	(9,3±3,01)*
Перехворіли на ГРВІ не SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=4)	3,2±1,98
Примітка. * - p=0,02 порівняно з контрольною групою (перехворіли на ГРВІ не SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості)	

Таке зростання відбувалося практично у всіх дітей після CoV19 і не було виявлено у дітей з ГРВІ нековідної природи.

Дослідження антифосфоліпідних антитіл у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування.

При проведенні цього дослідження не було виявлено достовірного зростання рівнів антикардіоліпінових антитіл у дітей, що перехворіли на CoV19 порівняно з контрольною групою. Проте середній рівень антифосфотидилсеринових антитіл у дітей, що перехворіли на Cov19 був вищим (p=0,06). Так само доля дітей із позитивними рівнями антифосфотидилсеринових антитіл була вищою в дослідницькій групі порівняно з контрольною.

Дослідження рівня сироваткових загальних імуноглобулінів у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування

Рівні імуноглобулінів у всіх групах дітей, що перенесли коронавірусне інфікування були порівняні і не відрізнялись достовірно (табл. 2.79).

Таблиця 2.79 - Рівні загальних сироваткових імуноглобулінів (IgG, IgM та IgA) у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування,

г/л

Група дітей з різним перебігом захворювання	IgG	IgM	IgA
Перехворіли SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=6)	12,9±1,72	1,5±0,26	2,5±0,93
Перехворіли SARS-CoV-2 (легка форма) (n=10)	11,7±2,49	1,3±0,19	2,0±0,90
Перехворіли на ГРВІ не SARS-CoV-2 (середній ступінь тяжкості) (n=4)	13,2±2,01	1,4±0,31	3,0±0,45

Стан дітей після перенесення CoV19 інфекції відрізняється від стану дорослих жінок. Так у дорослих спостерігається виснаження НК НКТ ланок природньої резистентності після хвороби тоді як у дітей занепаду НК лімфоцитів не спостерігається а популяція НКТ клітин навпаки зростає після захворювання. Це може свідчити що потенціал до генерації природньої резистентності у дітей набагато вищій і це може бути однією з причин чому у дитячому та молодому віці

перебіг CoV19 як правило не супроводжується ускладненнями і відбувається у безсимптомній чи легкій формах.

Таким чином, стан імунної системи у жінок та дітей визначає спосіб та потужність реагування на вірусну інвазію проте агресивність вірусного процесу та кількість вірусних частинок може перевищити потенціал природніх механізмів та прорвати цю первинну лінію захисту. Подальший перебіг захворювання в таких випадках залежить від швидкості формування та ефективності специфічних Т-клітинних та гуморальних механізмів. Надмірна активація природніх ланок на цьому етапі може призводити до погіршення стану організму та уповільнювати формування специфічної відповіді. Важкість перебігу коронавірусної інфекції у жінок та дітей впливає на подальший стан імунної системи та часто викликає виснаження ланок природньої резистентності. Проведені дослідження показали як часті інфекції у дітей призводять до зниження активності Толл-подібних рецепторів і таким чином створюється підґрунтя до повторних захворювань, що співпадає з результатами закордонних досліджень. Результати проведених досліджень показали, що так само відбувається за латентних цитомегаловірусних інфекцій у дорослих коли постійне напруження ланки НК та НКТ лімфоцитів призводить до їх виснаження. У жінок що перехворіли на SARS-CoV-2 у легкій формі було виявлено виснаження ланки НК та НКТ лімфоцитів. Цей стан може призводити до подальшої високої чутливості до інфекцій і потребує вивчення та розробки терапевтичних схем для його коригування. Виразна лімфопенія, що спостерігається під час SARS-CoV-2 є залежною від тяжкості перебігу коронавірусного інфікування, а також є предикативним маркером несприятливого клінічного перебігу хвороби.

2.2.4 Дослідження обміну вітаміну D в організмі жінок та дітей, що перенесли коронавірусне інфікування

При обстеженні жінок на наявність в крові вітаміну D в обох вікових групах було виявлено, що середнє значення вітаміну D відображає дефіцит і недостатність цієї речовини в майже рівних (біля 50 %) співвідношеннях (табл. 2.80) при легкому та середньому перебігу захворювання. Також можливо відзначити, що в обох групах дефіцит вітаміну D переважає над його недостатністю. Кількість жінок в групі до 30 років з оптимальним значенням вітаміну D більша ніж у жінок в групі після 30 років (табл. 2.80).

У дітей вікової групи від 6 до 10 років (табл. 2.81) та у дітей вікової групи від 11 до 18 років (табл. 2.81) з легкою і середньою ступеню перебігу захворювання спостерігається недостатність вітаміну D, а у дітей віком 11-18 років (табл. 2.81) з важкою формою (47 нМоль/л) - дефіцит цього вітаміну.

Серед обстежених дітей недостатність рівня вітаміну D зустрічалась майже в рівних співвідношеннях (45-50 %) при легкому і середньому перебігу хвороби, а при важкій формі хвороби дефіцит цього вітаміну до 100 %.

Середнє значення показника концентрації вітаміну D в плазмі крові обстежених ЖФВ, які перенесли коронавірусну хворобу становило (45,8±17,3) нмоль/л (рис. 2.38). Відомо, що концентрації вітаміну D нижче 50 нмоль/л призводять до порушень обміну та депонування кальцію в кістках. При цьому виражений дефіцит вітаміну D спостерігається при концентраціях його в крові нижче 30 нмоль/л.

Середнє значення показника концентрації вітаміну D в плазмі крові у жінок, які перенесли коронавірусну хворобу у віковій групі до 30 років становило (45.9±19,5) нмоль/л (рис. 2.39), а жінок вікової групи після 30 років (45,9±15,7) нмоль/л (рис.2.39).

Таблиця 2.80 – Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові у жінок фертильного віку (у віці до 30 років та після 30 років), що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від ступеня перебігу захворювання,

абс.ч., (%)

Ступінь перебігу захворювання	Кількість жінок, (абс.)	Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові у жінок у віці до 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування						
		Середнє значення (нМоль/ л)	Дефіцит вітаміну D, (показник нижче 50 нМоль/л)		Недостатність вітаміну D, (показник від 50 до 75 нМоль/л)		Норма вітаміну D, (показник від 75 до 125 нМоль/л)	
			кількість (абс.)	%	кількість (абс.)	%	кількість (абс.)	%
Легка	5	47,3	4	80	-	-	1	20
Середня	16	51,1	11	69	2	12	3	19
Важка	1	-	-	-	-		-	
		Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові у жінок у віці після 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування						
Легка	38	57,8	18	48	15	39	5	13
Середня	27	41,2	20	74	4	15	3	11
Важка	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2.81 - Показники рівня вітаміну D 25-ОН в сироватці крові у дітей (у віці від 6 до 10 років та у віці від 11 до 18 років), що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від ступеня перебігу захворювання,

абс.ч., (%)

Ступінь перебігу захворювання	Кількість дітей, (абс.)	Показники рівня вітаміну D 25-ОН в сироватці крові у дітей у віці від 6 до 10 років, що перенесли коронавірусне інфікування						
		Середнє значення, (нМоль/ л)	Дефіцит вітаміну D, (показник нижче 50 нМоль/л)		Недостатність вітаміну D, (показник від 50 до 75 нМоль/л)		Норма вітаміну D, (показник від 75 до 125 нМоль/л)	
			кількість, (абс.)	%	кількість, (абс.)	%	кількість, (абс.)	%
Легка	6	73,2	-	-	2	33	4	67
Середня	11	54,2	4	36	5	45	2	19
Важка	3	71,0	-	-	2	67	і	33
		Показники рівня вітаміну D 25-ОН в сироватці крові у дітей у віці від 11 до 18 років, що перенесли коронавірусне інфікування						
Легка	8	74,2	-	-	4	50	4	50
Середня	35	60,7	13	37	16	46	6	17
Важка	4	47,0	4	100	-	-	-	-

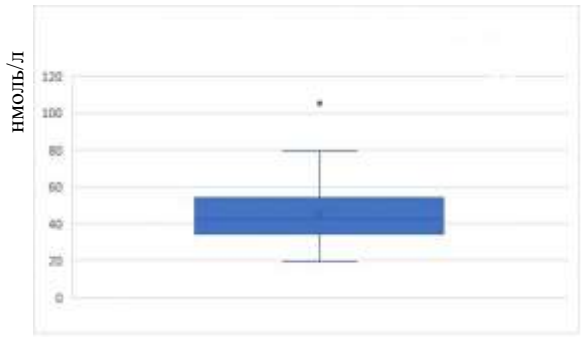


Рисунок 2.38 – Діаграма розподілу середнього значення показника вітаміну D у жінок, що перехворіли на коронавірусну інфекцію.

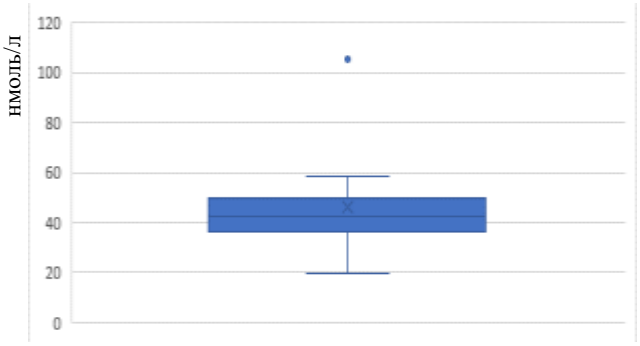


Рисунок 2.39 – Діаграма розподілу середнього значення показника вітаміну D у жінок віком до 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування.

Усі три показники середніх значень концентрації вітаміну D (рис. 2.40) мали нижню границю показника стандартного відхилення що відповідала значному дефіциту цього вітаміну.

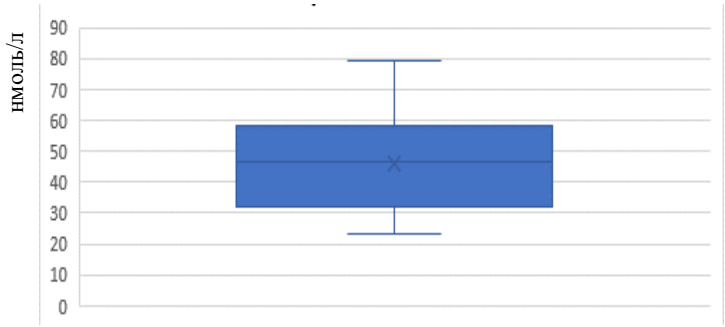


Рисунок 2.40 – Діаграма розподілу середнього значення показника вітаміну D у жінок віком після 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування.

Значення показників концентрації імуноглобулінів до коронавірусу корелювали з показниками концентрації вітаміну D у обстежених жінок, так коефіцієнт кореляції Пірсона між концентрацією вітаміну D та IgG anti-Cov19 IP становив 0,33, між концентрацією вітаміну Д та IgM anti-Cov19 IP цей показник становив 0,22, а між концентрацією вітаміну Д та IgA anti-Cov19 IP цей показник становив 0,2. Отримані коефіцієнти кореляції вказують на зв’язок між недостатністю вітаміну D у обстежених жінок та перебігом коронавірусної

хвороби, що також підтверджується наявністю кореляції між розчинним ферментом IL-2 та недостатністю вітаміну D, цей показник становив 0,31.

Таким чином, проведені дослідження рівня вітаміну D у жінок вікових груп до 30 років та після 30 років з легким і середнім перебігом хвороби показали, що у жінок, які перенесли коронавірусне інфікування спостерігається дефіцит вітаміну Д, який переважав над нормативними значеннями від 48 % до 80 %; а у дітей з важкою формою хвороби – 100 %.

2.2.5 Визначення вмісту ферментів креатинкінази та лактатдегідрогенази в сироватці крові в організмі жінок та дітей, що перенесли коронавірусне інфікування

При визначенні ферменту КК у жінок обох вікових груп (табл. 2.82) було виявлено незначне підвищення показників цього ферменту (у жінок до 30 років – до 29 %; у жінок після 30 років – до 25 %). Але ми не можемо стверджувати, що ці показники відображають ступінь тяжкості перебігу хвороби.

Однак у жінок з легкою ступеню перебігу хвороби збільшення КК в обох групах виявилось більшим, ніж у жінок з середньою ступеню тяжкості (у жінок до 30 років - на 17 %, а у жінок після до 30 років - на 10 %).

При визначені ферменту ЛДГ (табл. 2.82) середній відсоток збільшення концентрації ферменту в обох групах був незначний до 7 % при всіх ступенях тяжкості перебігу хвороби. Але в групі жінок після 30 років спостерігається значне підвищення рівня ЛДГ відносно норми у майже 40 % обстежених (легка – 42 %; середня – 41 %), що корегує з літературними даними. Також у 2 жінок після 30 років (7 %) при перебігу хвороби середньої тяжкості було виявлено збільшення показника цього ферменту майже на 300 %.

Середнє значення показника ЛДГ (рис. 2.41) у ЖФВ, які перенесли коронавірусну хворобу становило (339,3±321,2) Е/л, високий показник стандартного відхилення спричинений тим, що у двох пацієнток концентрація ЛДГ

в крові становила 1729 Е/л та 1357 Е/л, ці дві пацієнтки відносились до вікової групи після 30 років.

Детальний аналіз даних історій хвороб цих двох пацієнток показав відсутність пневмонії за результатом комп'ютерної томографії, кількість лейкоцитів в загальному аналізі крові була в межах норми. Звертало на себе увагу підвищення рівня СРБ у пацієнтки з показником ЛДГ в крові 1729 Е/л, який поступово знижувався і підчас виписки знаходився в межах норми. У другої пацієнтки з показником ЛДГ 1357 Е/л в анамнезі були захворювання, викликані Herpes Zoster. Важливо відмітити, що у обох цих жінок показник КК був не найвищим у групі.

У жінок вікової групи до 30 років середнє значення показника ЛДГ (рис. 2.42) становило (328,7±108,9) Е/л.

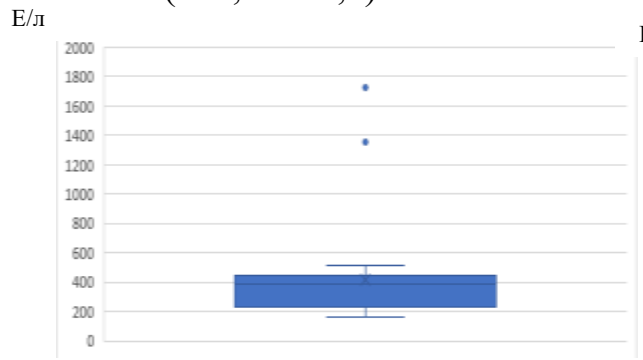


Рисунок 2.41 – Діаграма розподілу середнього значення показника лактатдегідрогенази у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування.

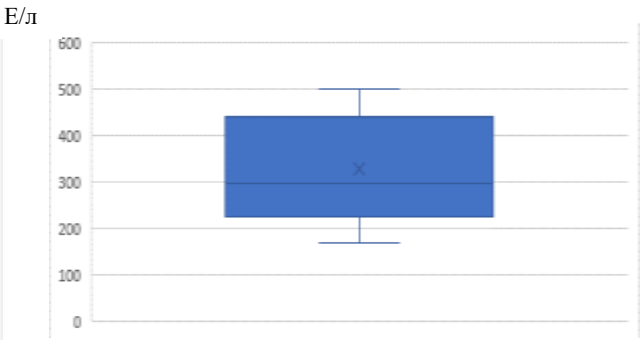


Рисунок 2.42 - Діаграма розподілу середнього значення показника лактатдегідрогенази у жінок віком до 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування.

У жінок вікової групи після 30 років середнє значення показника ЛДГ (рис. 2.43) цей показник був (490±420,1) Е/л.

Таблиця 2.82 - Визначення рівня креатинкінази (Е/л) та лактатдегідрогенази (Е/л) в сироватці крові у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від ступеня перебігу захворювання,

абс.ч, (%)

Ступінь перебігу захворювання	Жінки до 30 років				Жінки після 30 років			
	Кількість жінок, (абс.)	Середнє значення креатинкі-нази, (Е/л)	Кількість жінок з показником норми (%) (N=24-145 Е/л)	Кількість жінок з підвищеним показником	Кількість жінок, (абс.)	Середнє значення креатинкі-нази, (Е/л)	Кількість жінок з показником норми (%) (N=24-145 Е/л)	Кількість жінок з підвищеним показником
Легка	5	188	29	2 (40)	38	182	25	18 (47)
Середня	16	163	12	9 (56)	27	167	15	12 (44)
Важка	1	-	-	-	-	-	-	-
Ступінь перебігу захворювання	Жінки до 30 років				Жінки після 30 років			
	Кількість жінок, (абс.)	Середнє значення лактатде-гідрогенази, (Е/л)	Кількість жінок з показником норми (%) (N=225-450 Е/л)	Кількість жінок з підвищеним показником	Кількість жінок, (абс.)	Середнє значення лактатде-гідрогенази, (Е/л)	Кількість жінок з показником норми (%) (N=225-450 Е/л)	Кількість жінок з підвищеними показником
Легка	5	467	4	3 (60)	38	416	-	16 (42)
Середня	16	322	-	1 (6)	27	480	7	11 (41)
Важка	1	-	-	-	-	-	-	-

Середнє значення показника КК (рис. 2.44) у ЖФВ, які перенесли коронавірусну хворобу становило (160,8±40,6) Е/л.

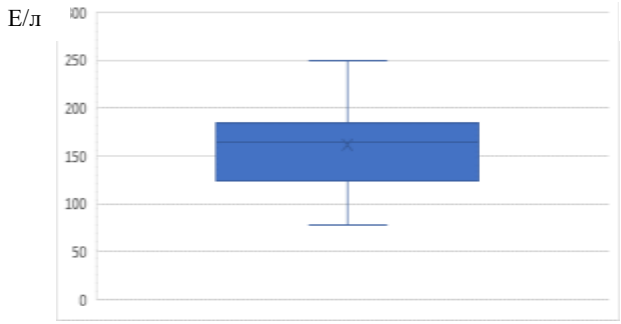


Рисунок 2.43 - Діаграма розподілу середнього значення показника лактатдегідрогенази у жінок віком після 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування.

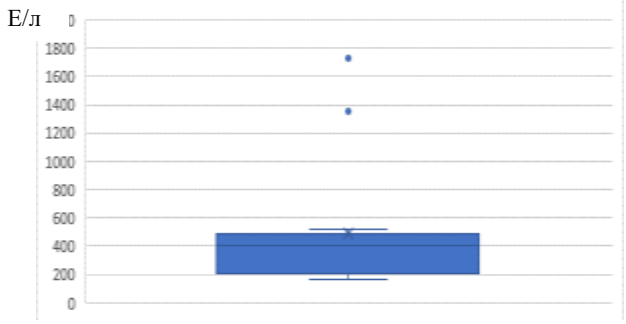


Рисунок 2.44 – Діаграма розподілу середнього значення показника креатинкінази у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування.

У обстежених жінок вікової групи до 30 років (рис. 2.45) середнє значення показника КК становило (159,1±37,9) Е/л.

У обстежених жінок вікової групи після 30 років (рис. 2.46) середнє значення показника КК становив (167,4±38,1) Е/л.

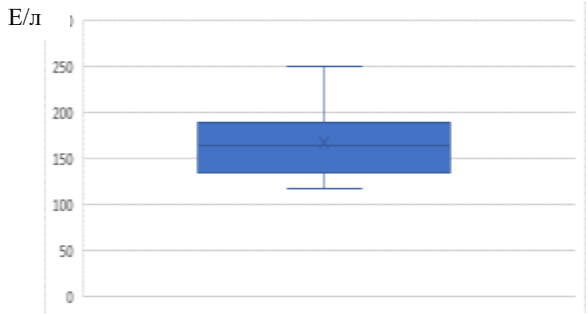


Рисунок 2.45 - Діаграма розподілу середнього значення показника креатинкінази у жінок віком до 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування.

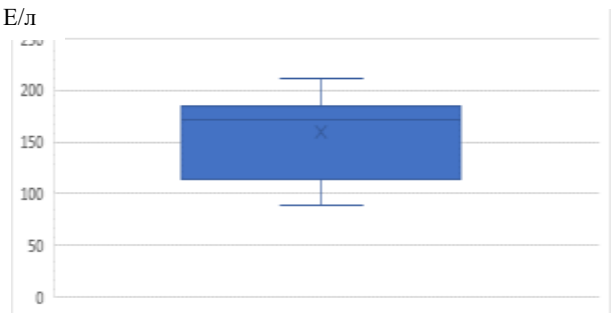


Рисунок 2.46 - Діаграма розподілу середнього значення показника креатинкінази у жінок віком після 30 років, що перенесли коронавірусне інфікування

Показник коефіцієнта кореляції Пірсона між значеннями ЛДГ та КК у жінок віком до 30 років становив 0,269, що вказує на наявність слабкого позитивного

зв’язку. У групі жінок віком після 30 років показник коефіцієнта кореляції Пірсона наближався до 0 і становив -0,0361, проте після коригування коефіцієнта по двох випадках значного перевищення концентрації ЛДГ в крові обстежених жінок він становив -0,187, що вказує на наявність слабкого зворотного зв’язку.

При визначенні КК у дітей (табл. 2.83) обох груп було виявлено суттєве підвищення середнього показника концентрації ферменту від 20 % до 40 %, але цей показник не залежить від ступеня перебігу захворювання. Найбільша кількість дітей (91 %) з підвищеними показниками КК виявлено в групі 6-10 років з середньою ступеню важкості перебігу хвороби. А серед дітей 11-18 років половина мала високі показники КК (від 51 % до 50 %) в групах з середньою та важкою формами перебігу захворювання.

При визначенні ЛДЕ (табл. 2.83) незначне підвищення середнього значення цього ферменту спостерігається тільки у дітей віком 11-18 років з тяжким перебігом захворювання (9 %). Також серед цієї вікової групи кількість дітей у, яких рівень ферменту ЛДЕ перевищує норму розподілявся в залежності від ступеня тяжкості таким чином: легка – 37 %; середня – 20 %; важка -75 %.

Отже, можна зазначити, що кількість дітей з підвищеним рівнем креатинкінази вища, ніж у жінок. Це пояснюється тим, що у дітей активність КК вища, ніж у дорослих завдяки інтенсивному росту та активності тканин багатих цим ферментом - м'язової та нервової систем. Більш ніж у 40 % обстежених жінок віком після 30 років спостерігалось підвищення рівня ЛДГ та КК при легкому і середньому перебігу хвороби. В групі обстежених дітей віком 11-18 років спостерігається найбільш суттєве підвищення рівня ЛДГ, яке виявлено виявлено при тяжкому перебігу хвороби у 75 % дітей, що перехворіли на коронавірусне інфікування. Отримані дані кореляційних взаємозв’язків між рівнем креатинкінази та лактатдегідрогенази у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування вказують на більшу вірогідність розвитку кардіологічних порушень при прогнозі віддалених результатів перенесеної коронавірусної хвороби у жінок вікової групи після 30 років, та більшу вірогідність розвитку неврологічних порушень у жінок у віці до 30 років.

Таблиця 2.83 - Визначення рівня креатинкінази (Е/л) в сироватці крові у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування в залежності від ступеня перебігу захворювання,

абс.ч, (%)

Ступінь перебігу захворювання	Діти віком 6-10 років				Діти віком 11-18 років			
	Кількість дітей, (абс.)	Середнє значення креатинкі-нази, (Е/л)	Кількість дітей з показником норми (%) (N=24-145 Е/л)	Кількість дітей з підвищеним показником	Кількість дітей, (абс.)	Середнє значення креатинкі-нази, (Е/л)	Кількість дітей з показником норми (%) (N=24-145 Е/л)	Кількість дітей з підвищеним показником
Легка	6	203	40	4 (67)	8	135	-	1 (12)
Середня	11	184	27	10 (91)	35	171	18	18 (51)
Важка	3	127	-	1 (33)	4	178	23	2 (50)
Ступінь перебігу захворювання	Діти віком 6-10 років				Діти віком 11-18 років			
	Кількість дітей, (абс.)	Середнє значення лактатдегід-рогенази, (Е/л)	Кількість дітей з показником норми (%) (N=225-450 Е/л)	Кількість дітей з підвищеним показником	Кількість дітей, (абс.)	Середнє значення лактатдегід-рогенази, (Е/л)	Кількість дітей з показником норми (%) (N=225-450 Е/л)	Кількість дітей з підвищеним показником
Легка	6	396	-	3 (50)	8	450	-	3 (37)
Середня	11	312	-	2 (18)	35	390	-	7 (20)
Важка	3	276	-	-	4	491	9	3 (75)

2.2.6 Особливості стану серцево-судинної системи у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування

Були проведені дослідження стану серцево-судинної системи у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування у порівнянні з жінками, що не хворіли на коронавірусну інфекцію. Більшість обстежених ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування скаржились на задуху 85 жінок (70,8 %) та болі в грудній клітці – 93 жінки (77,5 %), відчуття нестачі дихання - 78 жінок (65,0 %), втрату нюху та смаку – 111 жінок (92,5 %). Аналіз результатів комп'ютерної томографії показав відсутність масивної інтерстиціальної вірусної пневмонії у переважної більшості обстежених жінок (109 (90,8 %)). Проте рентгенологічна картина вказувала на наявність набряку бронхіального дерева, що, в свою чергу, не дозволяло виключити можливість появи запального процесу, або фіброзу перикарду та міокарду.

При аналізі результатів електрокардіограми ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування були виявлені певні зміни. У ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування на елктрокардіограмі виявлені зміни в міокарді, на що вказували зміни максимальної тривалості зубця Р та площа Р хвилі, такі зміни виявлялись у 67 (55,83 %) жінок, які перенесли коронавірусну хворобу, та їх кількість достовірно відрізнялась від кількості жінок з такими змінами на електрокадіограмі, які не хворіли на коронавірусну хворобу 34 (26,15 %), $p<0.05$. Дисперсія зубця Р залишалась майже не зміненою, що вказувало на початкові прояви діастолічної дисфункції Наявність фрагментованого комплексу QRS, що проявлялось у наявності додаткового зубця Р визначалась у 65 (54,17 %) жінок, які перенесли коронавірусну хворобу та цей показник достовірно відрізнявся від показника у жінок, які не хворіли на коронавірусну хворобу 21 (17,5 %), $p<0.05$. У 80 ЖФВ, які перенесли коронавірусне інфікування, що складало 66,7 % від загальної кількості жінок в групі виявлялось зниження вольтажу Q хвилі, а у жінок, які не хворіли на коронавірусну хворобу такі зміни на елекрокардіограмі виявлялись у 45 випадках, що складало 16,7 % від загальної кількості жінок в групі. Зниження вольтажу QS хвилі виявлялось у 73 жінок (60,83 %), які перенесли

коронавірусну інфекцію, та у 41 жінки (31,54 %), які не хворіли на коронавірусну хворобу. Високий зубець R визначався у 92 (76,67 %) жінок основної групи та 56 (43,08 %) жінок групи контролю. Незначні ізольовані зміни тривалості та вольтажу зубця ST у вигляді елевації сегмента ST виявлялись у 53 (44,17 %) жінок основної групи та 21 (16,15 %) жінок контрольної групи, при цьому зміни цього сегменту не мали достатньої вираженості та характерної клінічної картини, що відображає гострий коронарний синдром. В деяких випадках такі зміни сегменту ST можуть вказувати на наявність вогнищевих запальних змін в ділянці лівого шлуночка. У жінок, які не мали ознак елевації сегменту ST визначались незначні ізольовані зміни тривалості та вольтажу зубця Т, такі зміни виявлялись у 29 (24,17 %) жінок основної групи та у 11 (8,46 %) жінок групи контролю. Блокада правої ніжки пучка Гіса виявлялась у 15 (12,5 %) жінок основної групи та 12 (9,2 %) жінок групи контролю.

Описані зміни можуть бути діагностичними предикторами діастолічної дисфункції (гіпертрофії лівого шлуночка в фазу діастоли). Такі зміни є досить характерними для людей у віці після 45 років та є ознакою інтерстиційного фіброзу міокарду, що супроводжує початок гіпертонічної хвороби. В тім у всіх обстежених жінок моніторинг артеріального тиску протягом лікування коронавірусної хвороби не виявив перевищення показників артеріального тиску поза норми, встановлені всесвітньою організацією охорони здоров’я. Причинами таких змін може бути як фіброз тканин міокарду, який виник через перенесену респіраторну вірусну інфекцію так і через виникнення ендотеліальної дисфункції адже дослідження рецепторного апарату клітин міокарду та судин серця вказують на високу репрезентацію рецепторів ангіотензинперетвроюючого ферменту 2 типу на їх поверхні.

Проведені дослідження дозволяють стверджувати, що ЖФВ, які перенесли коронавірусне інфікування мають бути віднесені до групи ризику появи кардіологічної патології при плануванні вагітності та у випадку виснажливої фізичної роботи, або роботи пов’язаної із тривалим психоемоційним навантаженням. Використання електрокардіографічних методів дослідження не

найбільш точним методом у діагностиці змін міокарду, тому всім жінкам, у яких були виявлені зміни на ЕКГ було рекомендовано пройти ехографію серця. У якості допоміжного методу, особливо для первинної ланки надання медичної допомоги аналіз ЕКГ дасть можливість оцінити ризик розвитку ускладнень, пов'язаних із коронавірусною хворобою, як підчас гострого запалення, так і при діагностиці віддалених результатів перенесення цього захворювання. Найбільш типовими віддаленими змінами в стані серцево-судинної системи у жінок, що перенесли коронавірусне інфікування можуть бути гіпертрофія лівого шлуночка, потовщення міжшлуночкової перетинки, збільшення тиску в легеневій артерії та зменшення фракції викиду лівого шлуночка.

2.3 Результати досліджень та їх обговорення ІІ етапу виконання проєкту в 2021 року

2.3.1 Результати клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом, показників стану репродуктивного здоров'я та визначення клініко-статистичних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України

Для визначення загального стану здоров'я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом, показників стану РЗ та визначення клініко-статистичних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування були проведені клініко-епідеміологічні дослідження в різних регіонах України з проведенням анкетування жінок, лікарського інтерв'ю та всебічного обстеження жінок. Такі дослідження проводились в місті Києві, Львівській, Тернопільській, Чернівецькій, Харківській та Київській областях України.

Результати проведених клініко-епідеміологічних та соціологічних досліджень дозволили з'ясувати, що для поширення захворювання у жінок мають

значення такі фактори, як вік жінок, соціальний статус та умови праці, стресорні навантаження на організм та наявність шкідливих звичок.

Аналіз показників характеру перебігу захворювання на коронавірус у обстежених жінок та потенційних шляхів зараження на коронавірусну інфекцію показав, що значний вплив на погіршення перебігу захворювання могли спричиняти відвідування масових заходів (підвищує ризики в 1,5 рази) і стихійних ринків (підвищує ризики в 2,25 рази), зміна роботи (підвищує ризики в 9,5 рази) і знахлдження на роботі в одному приміщенні трьох і більше співробітників (підвищує ризики в 3 рази), а також поїздки родичів за кордон (підвищує ризики в 14,5 рази). Отримані дані вказують на те, що значною мірою на погіршення перебігу коронавірусної хвороби впливає швидкість розвитку симптомів та швидкість захворювання родичів жінок, особливо якщо в родині були померлі від коронавірусної інфекції (підвищує ризики в 2,1 рази). Результати досліджень дозволили отримати важливі дані, що повторні захворювання на коронавріусну інфекцію також підвищують шанси погіршення її перебігу.

Результати статистичного та математичного обрахування клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом, показників стану РЗ клінічних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України представлені в Додатку 7 до розділу 2, підрозділа 2.3.1, в томі ІІ.

2.3.2 Результати клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом та визначення клініко-статистичних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України

Для визначення загального стану здоров'я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом, визначення клініко-статистичних, медико-біологічних,

соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування були проведені клініко-епідеміологічні дослідження, з проведенням анкетування дітей з батьками, лікарського інтерв'ю та всебічного обстеження дітей, в тих же регіонах України де проводились такі дослідження серед жінок: в місті Києві, Львівській, Тернопільській, Чернівецькій, Харківській та Київській областях України.

Результати проведених клініко-епідеміологічних та соціологічних досліджень дозволили визначити, що для поширення захворювання у дітей мають значення негативні соціальні та санітарно-гігієнічні умови мешкання, рівень життя сім'ї дитини нижче прожиткового мінімуму та незадовільний матеріальний стан сім'ї вцілому, наявність супуньої хронічної патології з хронічними вогнищами інфекції та несприятлих перинатальних факторів, шкідливі звички у батьків, частіше у вигляді тютюнопаління при якому діти були пасивними курцями.

Аналіз показників характеру перебігу захворювання на коронавірус у обстежених дітей та потенційних шляхів зараження на коронавірусну інфекцію показав, що: незважаючи на перевагу хлопчиків серед опитуваних дітей різних областей України не встановлено статистично вірогідного зв'язку впливу чоловічої статі на захворюваність COVID-19 у дітей, шанси інфікування на коронавірус серед дітей, які мешкають в місті порівняно з сільською місцевістю, в 7,9 разів вище, вірогідність захворювання на коронавірус (в 7,7 разів) вища у дітей, в сім'ях яких доход складав нижче в 1,5-2 рази рівня прожиткового мінімуму, в разі коли діти не оздоровлювались та не приймали вітамін Д ризик захворювання на коронавірус у них збільшувався відповідно в 4,9 та 3,8 рази, діти, що мали супутній хронічний тонзиліт мали вірогідність захворіти в 2,9 рази вище.

Результати статистичного та математичного обрахування клініко-епідеміологічних досліджень загального стану здоров'я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом, показників клінічних, медико-біологічних, соціологічних та епігенетичних факторів ризику поширення коронавірусного інфікування в різних областях України представлені в Додатку 8, до розділу 2, підрозділу 2.3.2, Том I).

2.4 Результати визначення епігенетичних предикторів в організмі жінок з коронавірусним інфікуванням, які можуть бути факторами ризику для поширення і перебігу коронавірусної інфекції

2.4.1 Оптимізований метод молекулярно-генетичного вимірювання довжени теломер

Запропонований метод мультиплексної монохромної кількісної ПЛР характеризується високою точністю та відтворюваністю, що підтверджується даними представленими на рисунку 2.47, D. В результаті оптимізації відхилення між повторами одного зразку були менше 0.3 Ct (рис. 2.47, A, B, D). Оскільки, ампліфікація теломерних послідовностей відбувалась в одному епендорфі із геном альбуміну, і детекція обох продуктів відбувалась за участі інтеркалюючого агенту, то необхідно було розділити сигнали від двох продуктів, що є можливим лише при виконанні двох вимог: по-перше - продукти мають перетинати поріг зі значним інтервалом; по-друге - продукт, який виходить другим, повинен мати значно вищу температуру плавлення. Після зменшення кінцевої концентрації кожного з праймерів *albd* та *albu* до 250нМ та теломерних праймерів *telg* та *telc* до 450нМ вдалось отримати значну різницю між Ct для теломерної послідовності (Ct=17) та гена альбуміну (Ct=28) (рис. 2.47, A, B). Праймери для гена альбуміну несли додаткові GC-послідовності на 5’-кінці, які не були комплементарними фланкованому фрагменту ДНК. Ці послідовності були внесені для збільшення температури плавлення, що зробило можливим розділення сигналів від ампліконів з теломерних послідовностей та ампліконів для гена альбуміну при детекції останнього за температури 88°C (рис. 2.47, C). На кривих плавління бачимо, що амплікони від теломерних послідовностей мають пік плавління за температруи 82°C повністю розплавлені при температурі 88°C, в той час, як амплікони від гена альбуміну ще не почали своє плавління за цих температур і має пік плавління за температури 93°C.

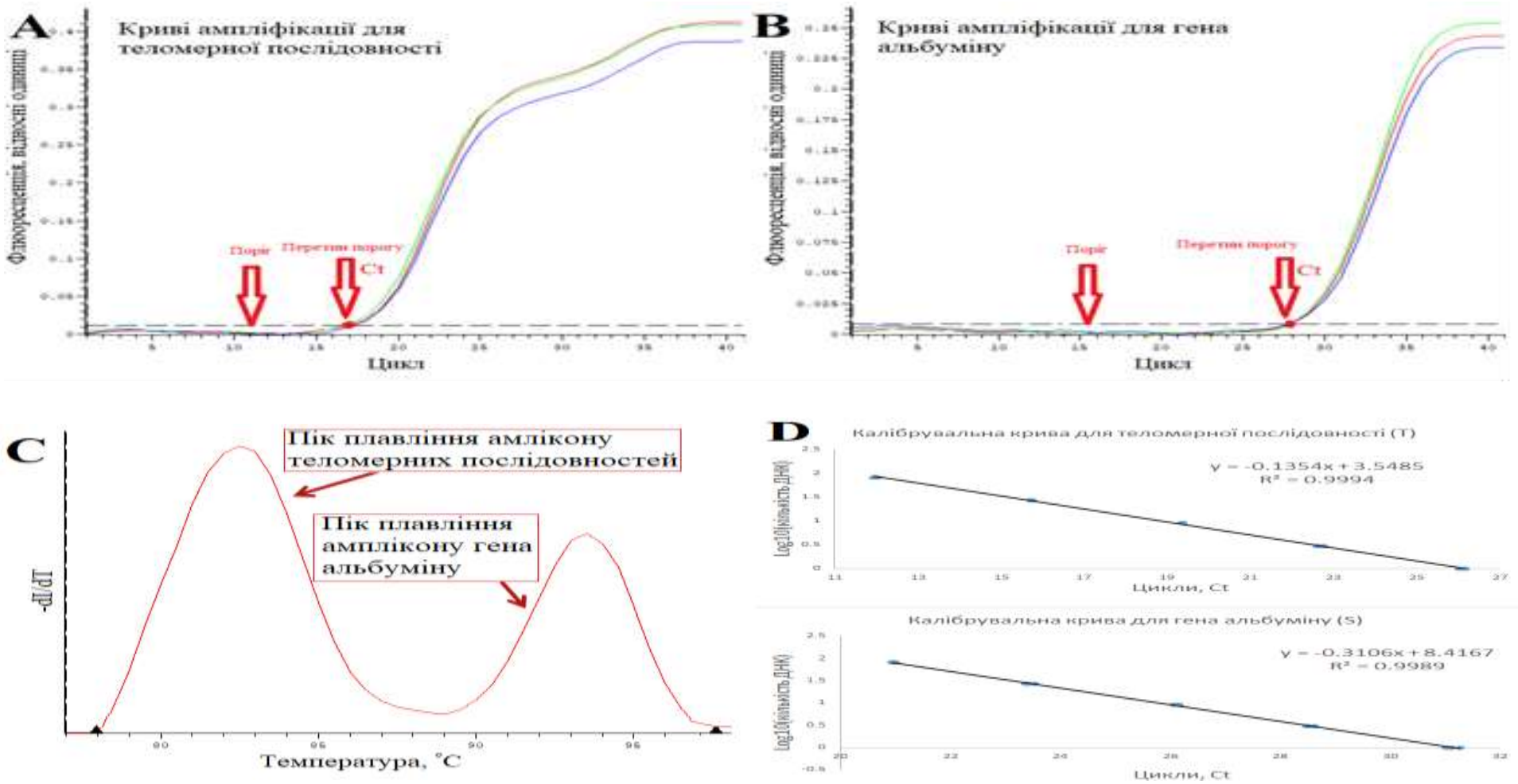


Рисунок 2.47 - Характеристичні параметри мультиплексної монохромної кількісної полімеразної ланцюгової реакції: *A* – криві ампліфікації для теломерної послідовності; B – криві ампліфікації для гена альбуміну (однокопійного); C – крива плавління; D – стандартні криві; одна крива – для теломерної послідовності (T) та інша – для сигналу від гена альбуміну (однокопійного) (S).

2.4.2 Аналіз відносної середньої довжини теломер у обстежених жінок

Результати аналізу відносної середньої довжини теломер в групі обстеження жінок, що перехворіли на COVID-19 та індивідів жіночої статі з контрольної групи наведено в таблиці 2.84.

Результати порівняльного аналізу відносної середньої довжини теломер між групою обстеження та контрольною групою представлені на рис. 2.48.

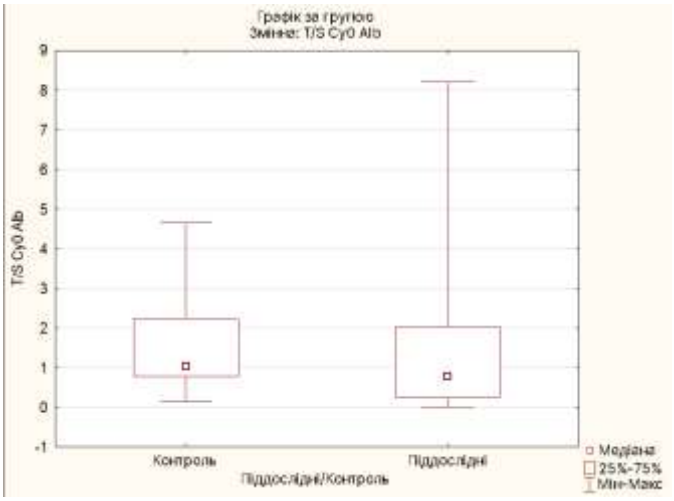


Рисунок 2.48 - Розподіл довжини теломер лейкоцитів (відносна середня довжина теломер) в групі обстеження жінок, що перехворіли на COVID-19 та в групі здорових жінок

За результатами перевірки нормальності розподілу змінних при використанні тесту Шапіро-Вілка отримали свідчення на користь того, що розподіл довжини теломер у досліджуваних групах не відповідає нормальному.

Саме тому відмінності довжини теломер (табл. 2.85) в досліджуваній групі

Таблиця 2.85 - Результати порівняльного аналізу відносної середньої довжини теломер з використанням критерію Манно-Вітні в досліджуваних групах

U тест Манна-Вітні (з корекцією неперервності)
За змінною: піддослідні/контроль
Виділені тесфти є значущими за p<.05000
Включити умову: Дорослі = 2

змінна	Сума Група 1	Сума Група 2	U	Z	p	скориговане Z	p	Дійсне N Група 1	Дійсне N Група 2	2*1-бічне точне p
T/S Cy0 Alb	3584.000	2087.000	809.0000	-2.57727	0.009959	-2.57727	0.009959	74	32	0.009468

Таблиця 2.84 - Розподіл показників T/S до Alb (відносна середня довжина теломер лейкоцитів) серед жінок, які перенесли захворювання на COVID-19 та здорових індивідів жіночої статі з контрольної групи

Контрольна група		Група пацієнтів					
№ зразка	T/S Cy0 Alb	№ зразка	T/S Cy0 Alb	№ зразка	T/S Cy0 Alb	№ зразка	T/S Cy0 Alb
1	2	3	4	5	6	7	8
18к	0,13839925	91	0,010133494	34	0,473167339	81	1,758561625
26к	0,316993076	118	0,039259682	157	0,488683553	35	2,010801768
17к	0,366583527	110	0,051643553	148	0,564291409	66	3,058787848
8к	0,465480108	109	0,052807403	41	0,583062422	78	3,581676524
19к	0,470360979	130	0,066054373	158	0,612055226	54	3,661976974
7к	0,470837518	163	0,070230398	101	0,649594876	105	3,699293229
23к	0,538050713	151	0,077334274	21	0,652755557	63	4,533707679
5к	0,708486934	160	0,08374185	100	0,734323017	55	5,746960082
22к	0,842750242	141	0,12174984	26	0,764460167	61	6,63330565
30к	0,852958758	161	0,12624069	23	0,773494584	73	8,199416011
6к	0,877552122	139	0,149562155	20	0,795702829		
20к	0,898113641	117	0,158582689	8	0,820193205		
28к	0,904256691	129	0,159597913	98	0,824142121		
24к	0,907673195	137	0,171210811	106	0,844745632		
25к	0,919957839	94	0,185388596	104	1,030805768		

Продовження табл. 2.84

1	2	3	4	5	6	7	8
2к	0,974765164	142	0,190749261	39	1,15901174		
21к	1,090012979	143	0,204270669	17	1,262831503		
29к	1,292480983	144	0,215784397	119	1,401514292		
31к	1,30865875	128	0,216118131	38	1,402856059		
4к	1,362873578	146	0,232624415	64	1,457224528		
3к	1,600036906	152	0,26655052	3	1,47747646		
27к	1,660043637	138	0,270372504	25	1,494467256		
1к	1,691858156	127	0,293797545	46	1,508485619		
12к	1,909443638	156	0,355324153	32	1,546764763		
14к	2,562213322	51	0,359421939	10	1,754224269		
32к	2,675527643	95	0,397007322	47	2,163875497		
16к	3,017279959	140	0,4233657	42	2,232814542		
9к	3,25575856	58	0,434223787	49	2,27775715		
13к	3,356543072	36	0,445798223	62	2,51942045		
10к	3,587673248	103	0,496854297	44	2,550389285		
11к	4,611898303	162	0,508460006	24	2,612656887		
15к	4,648357668	114	0,552076646	33	2,745374112		

жінок, що перехворіли на COVID-19 та в контрольній групі здорових жінок проводили з використанням критерію U тесту Манно-Вітні.

За результатами порівняльного аналізу відносної середньої довжини теломер з використанням критерію Манно-Вітні в досліджуваних групах були отримані наступні значення U=809.0; p-value=0,0094 що свідчить про статистично достовірне вкорочення відносної середньої довжини теломер у жінок, що хворіли на COVID-19 у порівнянні зі здоровими індивідами жіночої статі з контрольної групи.

2.5 Комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за жінками фертильного віку, які перенесли коронавірусне інфікування

Зважаючи на результати клініко-епідеміологічних, статистичних та соціологічних досліджень проведених останнім роком, щодо особливостей стану здоров'я жінок, що зазнали інфікування коронавірусом визначення ролі медико-біологічних факторів, як факторів ризику, стану загального, репродуктивного, психосоматичного здоров'я, визначених генетичних та епігенетичних маркерів, стану імунітету, обміну вітаміну D в організмі є підстави вважати, що жінки, які перенесли коронавірусне інфікування і видужали потребують пильного спостереження сімейними лікарями, лікарями-терапевтами та акушерами-гінекологами протягом року від дати одужання, а деколи цей термін подовжується до трьох місяців та до півроку.

Для лікування виявлених стресорних змін в комплексній терапії таким жінкам доцільно використовувати препарати антистресорної дії та препарати, що корегують негативний вплив ОС. Також для корекції дефіциту вітаміну D у таких жінок необхідно використовувати препарати, що вирівнюють цей дефіцит. Зміни стану згортальної системи крові потребують призначення препаратів, що розріджують кров та позитивно впливають на кровоплив. Зважаючи на те, що у

таких жінок відбувається загострення хронічних запальних захворювань статевих органів (ХЗЗСО), в комплексній терапії рекомендовано використовувати антибактеріальні та противірусні препарати в поєднанні з пробіотиками. Зміни гормональної регуляції менструальної функції потребують призначення, як гормональної так і негормональної терапії виявлених змін.

Розроблені за результатами науково-дослідної роботи ефективні методи діагностики, профілактики та лікування виявлених змін в організмі жінок після перенесеного коронавірусного інфікування були запропоновані для впровадження в систему охорони здоров'я України. Розроблений комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за ЖФВ, які перенесли коронавірусне інфікування представлений в додатку 9, том II.

2.6 Комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за дітьми шкільного віку, які перенесли коронавірусне (SASR-Cov-2) інфікування

Зважаючи на результати проведених клініко-статистичних та соціологічних досліджень щодо особливостей стану здоров'я дітей, що зазнали інфікування коронавірусом (SARS-Cov-2), визначення ролі медико-біологічних факторів, як факторів ризику, стану загального, психосоматичного здоров'я, визначених генетичних та епігенетичних маркерів, стану імунітету, обміну вітаміну D в організмі є підстави вважати, що діти, які перенесли коронавірусне інфікування і видужали потребують спостереження сімейними лікарями, лікарями-педіатрами протягом року від дати одужання. Розроблений комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за дітьми шкільного віку, які перенесли коронавірусне (SASR-Cov-2) інфікування представлений в додатку 10, том II.

2.7 Вивчення ефективності розроблених лікувально-профілактичних заходів для жінок і дітей, які перенесли COVID-19 з визначенням показників імунітету, дослідженням обміну вітаміну D та показників згортальної системи крові в організмі жінок та дітей

2.7.1 Клінічна характеристика та показники стану здоров'я жінок до та після лікувальних та профілактичних заходів

Вивчення ефективності розроблених лікувально-профілактичних заходів була проведена у 68 жінок, які перенесли COVID-19. Результати статистичного та математичного обрахування клініко- соціологічних та психологічних показників стану загального і репродуктивного здоров'я у жінок, що перенесли коронавірусне інфікування до та після лікування представлені в додатку 11, том II.

За рівнем освіти (табл. 2.86) більшість жінок були з вищою освітою 45 (66,2 %), незакінчену вищу освіту – 4 (5,9 %) жінок, професійно-технічну - 12 (17,6 %), а середню освіту мали 6 (8,8 %), жінок.

За сімейним станом обстежені жінки (табл. 2.87) в більшості були з благополучної родини 67 (98,5%).

Стан втоми у жінок супроводжувався різними ознаками: у 72,1 % жінок загальною слабкістю, у 33,8 % - підвищеною пітливістю, у 38,2 % - "важкою головою", у 14,7 % - підвищеним серцебиттям, у 10,3 % - сухістю і першінням у роті, у 30,9 % - незначним підвищенням температури, у 11,8 % - постійним головним болем та у 14,7 % - болями у суглобах (табл. 2.88).

Захворювання у більшості жінок (60,3 %) розпочалось з підйому температури, також був присутній кашель (35,3 %), нежить (33,8 %) та нестача повітря (7,4 %) (табл. 2.89).

Погірше після появи ознак захворювання на коронавірус 25 % жінок відчули на 3 добу, 22,1 % - на 2 добу, а 20,6 % - на 1 добу (табл. 2.90).

Така ж тенденція спостерігалась щодо звернення до лікаря з приводу захворювання на коронавірус: 23,5 % жінок звернулись на 5 добу, 16,2% - на 2 добу, а 19,1 % - на 1 добу (табл. 2.90).

У більшості жінок завхорювання перебігало в середній (41,2 %), або в легкій (51,5 %) формах. Тяжку фору захворювання мали лише 7,4 % жінок (табл. 2.92).

На стаціонарному лікуванні протягом більше ніж тижня знаходились 23,5 % жінок, тиждень – 23,5 %, 3 доби – 8,8 %, 1 добу – 17,6 % (табл. 2.93).

Захворювання у 35,3 % жінок супроводжувалось появою мокротиння, слизового характеру (23,5 %), а у 5,9 % жінок гнійного (табл. 2.94).

Задишка відмічалась у 26,5 % жінок, яка у 17,6 % була після незначного перевантаження, у 14,7 % - при значному фізичному навантаженні та у 26,5 % - змішана (табл. 2.95).

Неврологічні порушення під час та після захворювання на коронавірус спостерігалось у 23,5 % жінок (табл. 2.96).

Визначення особливостей психосоматичного та психологічного стану після перенесеного коронавірусного інфікування проводились за допомогою спеціальних анкет. Так, результати психологічного тестування за анкетою PHQ-9 (табл. 2.97) показали, що зниження інтересу чи відчуття задоволення від виконання справ бувають протягом кількох днів у 38,2 % жінок, а протягом доби, більше половини часу у 13,2 %. Поганий настрій, відчуття пригнічення чи безнадії бувають в такому ж режимі, відповідно: у 39,7 % та у 14,7 % жінок також труднощі із засинанням, поверхневий сон або навпаки, надмірна сонливість в тому ж режимі, відповідно 33,8 % та, 17,6 % жінок, відчуття втоми або зниження енергії в тому ж режимі, відповідно 42,6 % та 20,6 % жінок та поганий апетит або переїдання в тому ж режимі, відповідно 26,5 % та 13,2 % жінок, труднощі з концентрацією уваги, наприклад, підчас читання газети чи перегляду телевізора в тому ж режимі, відповідно 33,8 % та 13,2 % жінок і сповільненість рухів та мовлення, помітна навіть для оточуючих, або навпаки, надмірна і непритаманна метушливість та активність в тому ж режимі, відповідно 23,5 % та 13,2 % жінок.

Визначення поглядів жінок на стан свого здоров’я за анкетою SF-36 показало, що 14,7 % жінок вважають своє здоров’я відмінним, 16,2 % - дуже добрим 50 % - добрим, 16,2 % - посереднім (табл. 2.98).

Результати психологічного тестування, за шкалою психоемоційного стресу Л. Рідера, жінок показали, що скоріше вважають себе людиною нервовою 44,1 % жінок, турбуються про свою роботу 48,6 % жінок, відчувають нервову напругу 42,6 %, у 39,7 % жінок повсякденна діяльність викликає велику напругу, у 29,4 % - спілкування з людьми у жінок часто викликає нервову напругу, до кінця дня 35,3 % жінок вважають себе абсолютно виснаженими фізично і психічно, а у 26,5 % в родині часто виникають напружені відносини (табл. 2.99).

Обстежені жінки хворіли на запальні захворювання статевих органів (табл. 2.100). Найбільшу групу захворювання статевих органів були у 23,5 % та у 17,6 % жінок відповідно, при цьому найбільш часто жінки хворіли на запальні захворювання піхви – 14,7 % та 13,2 % жінок відповідно, шийки матки – 7,4 % та 8,8 % жінок відповідно, придатків 5,9 % та 4,4 % жінок відповідно. Не хворіли на запальні захворювання статевих органів 70,6 % та 72,1 % жінок відповідно.

Серед гінекологічних захворювань у обстежених жінок найбільш часто зустрічались ерозії шийки матки статевих у 25 % та у 23,5 % жінок відповідно. Також були хронічні запальні захворювання органів – 4,4 % та 16,2 %, кісти яєчників – 2,9 % та 17,6% жінок відповідно. Після захворювання у 14,7 % жінок виявився генітальний ендометріоз, лейоміома матки – у 14,7 % та 17,6 % - синдром полікістозних яєчників (табл. 2.101).

Вагітність у 63,2 % та у 60,3% жінок до та після інфікування на COVID-19, не ускладнювалась, а у 7,4 % та 7,4 % жінок відповідно ускладнювалась. Серед ускладнень вагітності загроза переривання вагітності в I триместрі спостерігалась у 5,9 % та 2,9 % відповідно, загроза передчасних пологів у 2,9 % та 1,5 % жінок відповідно, до захворювання у 1,5 % спостерігалась загроза переривання вагітності в II триместрі та у 2,9 % - гестоз I I половини вагітності (табл. 2.102).

У 61,8 % та 58,8 % жінок до та після інфікування на COVID-19 відповідно ускладнень пологів не було, а у 8,8 % та 10,3 % жінок відповідно ускладнення були, у вигляді слабкості перейм – у 1,5 % жінок до захворювання, у вигляді патологічного прелімінарного періоду у 1,5 % жінок до захворювання та у 2,9% жінок після захворювання (табл. 2.103).

Оперативних втручань в пологах не було до та після інфікування на COVID-19 у 60,3 % та у 58,8 % жінок відповідно, а були у 4,4 % та у 8,8 % жінок. У 4,4 % і 7,4 % жінок відповідно операція кесарева розтину, у 5,9 % та у 4,4 % епізіотомія, у 2,9% жінок після інфікування на COVID-19 була перінеотомія та у 2,9 % жінок до та після захворювання накладання вихідних акушерських щипців (табл. 2.104).

Серед перенесених артифіційних абортів до захворювання їх було у 10,3 % жінок та після - у 5,9 % жінок. В терміні до 12 тижнів аборти були до інфікування на COVID-19 - у 10,3%, а після інфікування - у 2,9 %. Аборти в терміні після 12 тижнів до та після інфікування на COVID-19 були - у 2,9 %жінок (табл. 2.105).

Ускладнення після абортів після інфікування на COVID-19 були у 2,9 % жінок. (табл. 2.106).

Після лікування більшість ознак, що характеризували стан втоми у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування, мешканок міста Києва, за даними проведеного анкетування були майже відсутні. У 4,4 % жінок зберігалась загальна слабкість, у 5,9 % підвищена пітливість, у 2,9 % жінок були постійні головні болі та болі у суглобах (табл. 2.107).

Неврологічних порушень у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування після лікування виявлено не було.

Результати психологічного тестування за анкетою PHQ-9 проведеного у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування після лікування (табл. 2.108) показали значне зниження негативних проявів зміни настрою та проявів тривожності. Кількість жінок, у яких не виявлялось зниження інтересу чи відчуття задоволення від виконання справ підвищився з 39,7 % до 82,4 %, кількість жінок, які відмічають такі прояви протягом кількох днів зменшилась до 5,9 %, а кількість жінок, які відмічають такі прояви протягом доби, більше половини часу у зменшилась до 2,9 %. Також збільшилась кількість жінок, які відмічали, що поганий настрій, відчуття пригнічення чи безнадії їх ніколи не турбують з 38,2 % до 88,2 %. Відсоток жінок, які відчували поганий настрій, відчуття пригнічення чи безнадії протягом кількох днів зменшився до 4,4 %, а протягом дня до 1,5 %. Кількість жінок, які відчували труднощі із засинанням, поверхневий сон або

навпаки, надмірну сонливість в тому ж режимі зменшилась до 7,4 % та 1,5 % відповідно. Відчуття втоми або зниження енергії також відчувало менше жінок, лише 1,5 % жінок відмічали такі симптоми протягом кількох днів. Поганий апетит або переїдання також відмічало менше жінок, протягом кількох днів - 4,4 %, а протягом доби - 2,9 %. Менша кількість жінок протягом кількох днів відмічала труднощі з концентрацією уваги, наприклад, підчас читання газети чи перегляду телевізора, відповідно 2,9 %, а жінок, які виявляли такі ознаки протягом кількох днів після лікування виявлено не було. Сповільненість рухів та мовлення, помітна навіть для оточуючих, або навпаки, надмірна і непритаманна метушливість та активність в тому ж режимі після лікування відмічала менша кількість жінок, відповідно 23,5 % та 13,2 % жінок та поганий апетит, або переїдання в тому ж режимі, відповідно 26,5 % та 13,2 % жінок, труднощі з концентрацією уваги, наприклад, підчас читання газети чи перегляду телевізора в тому ж режимі, відповідно 33,8 % та 13,2 % жінок і сповільненість рухів та мовлення, помітна навіть для оточуючих, або навпаки, надмірна і непритаманна метушливість та активність в тому ж режимі, відповідно 1,5 % та 2,9 % жінок.

Визначення поглядів жінок на стан свого здоров'я за анкетою SF-36 після лікування показало, що кількість жінок, які вважають своє здоров'я відмінним збільшилась до 22,1 %, дуже добрим також до 22,1 %, 23,5 % жінок вважали своє здоров'я добрим, а кількість жінок, які вважають своє здоров'я посереднім знизилась до 5,9 % (табл. 2.109).

Результати психологічного тестування, за шкалою психоемоційного стресу Л. Рідера, жінок, що перенесли коронавірусне інфікування, мешканок міста Києва після лікування ,показали, що кількість тих, хто скоріше вважають себе людиною нервовою знизилось до 7,4 % жінок, кількість тих, які турбуються про свою роботу знизилось до 7,4 % жінок, кількість жінок, які відчувають нервову напругу знизилось до 8,8 %, кількість жінок у яких повсякденна діяльність викликає велику напругу знизилась до 5,9 %, у 4,4 % - спілкування з людьми у жінок часто викликає нервову напругу, до кінця дня 7,4 % жінок вважають себе абсолютно виснаженими

фізично і психічно, а у 7,4 % в родині часто виникають напружені відносини (табл. 2.110).

Після проведеного лікування кількість жінок, які хворіли на запальні захворювання статевих органів зменшилась (табл. 2.111). Захворювання статевих органів після лікування були у 4,4 % жінок, кількість жінок, які хворіли на запальні захворювання піхви знизилась до 2,9 % жінок, шийки матки до – 2,9 % жінок.

Серед гінекологічних захворювань у обстежених жінок після лікування ерозії шийки матки зустрічались у 2,9 %. Хронічні запальні захворювання статевих органів виявлялись у – 4,4 %, виявився генітальний ендометріоз у 1,5 % жінок, лейоміома матки – у 1,5 % та у 4,4 % - синдром полікістозних яєчників (табл. 2.112).

Отримані результати вказують на ефективність розробленого комплексу діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за ЖФВ, які перенесли коронавірусне інфікування, що підтверджено покращенням стану загального і репродуктивного здоров'я, зниженням стресорного навантаження на організм і покращенням психоемоційного стану.

Розроблений комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за ЖФВ, які перенесли коронавірусне інфікування був впроваджений в лікувальних закладах різних областей України, зокрема: Чернівецькій, Житомирській, Запорізькій, Сумській, Тернопільській, Львівській, Харківській, Дніпропетровській, Одеській областях та в місті Києві, що підтверджено актами впровадження (додаток 12, 13 Том II)

2.7.2 Клінічна характеристика та показники стану здоров'я дітей до та після лікувальних та профілактичних заходів

Для оцінки ефективності розробленого лікувально-профілактичного комплексу для дітей, які перенесли COVID-19 було обстежено 36 дітей віком від 9 до 16 років, які мешкають в м. Києві і навчаються в середній школі №70. Період

спостереження склав 38 днів. Результати статистичного та математичного обрахування клініко- соціологічних та психологічних показників стану загального здоров'я у дітей, що перенесли коронавірусне інфікування до та після лікування представлені в додатку 14, том II.

Лікувально-профілактичні заходи (ЛПЗ) обстеженим дітям здійснювали за системою курсового оздоровлення, що представляє собою сукупність взаємопов'язаних медичних, гігієнічних, психологічних та педагогічних заходів, які включали у відповідно до розробленого комплексу діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за дітьми шкільного віку, що перенесли коронавірусне (SASR-Cov-2) інфікування, наступні напрямки: підвищення санітарно-просвітницького рівня дітей та їх батьків, оптимізація режиму дня та відпочинку, дієтотерапія. фізкультурно-оздоровчі заходи, для отримання загально оздоровлюючого ефекту, підвищення адаптаційних можливостей дитини, корекція вивлених змін рівня вітаміну Д та покращення психічного здоров'я.

Клінічними критеріями ефективності проведених лікувально-профілактичних заходів були: динаміка рівнів адаптаційних можливостей дитячого організму за показниками АП, частота ГРЗ за останні 2 місяці, даних психологічного тестування (рівнів тривоги та депресії).

В таблиці 2.113 представлено розподіл обстежених дітей за віком та статтю

Серед обстежених дітей переважали дівчата (52,8 %), в той час як хлопці складали 47, 2 %. У віковому аспекті перевагу мали діти від 12-17 років (77,8 %).

Більшість дітей (97,2 %) перенесли легкий перебіг COVID-19 і лише одна дівчинка середньо-тяжкий. Аналізом клініко-епідеміологічних особливостей SARS-Cov2 інфекції серед спостережених дітей встановлено, що: 25 (69,4 %) дітей захворіли переважно через контакт з хворими в сім'ї та 9 (25,0 %) – через контакт в школі; 5 (13,9 %) перебували закордоном до початку захворювання; інкубаційній період після відомого контакту у 27 (75,0 %) дітей був до 7 днів; 6 (16,7 %) хворих дітей інфікували членів родини; 19 (52,8 %) дітей приймали профілактичні засоби, серед яких частіше вітамін С [10 (27,8 %)]; 29 (80,6 %) застосовували різні ЗІЗ; всі

діти були оглянуті лікарем своєчасно; ПЛР тестування проводилось 5 (13,9 %) дітей; серед симптомів хвороби перевагу мали слабкість [(у 18 (50,0 %)], нежить [(у 14 (38,8 %)], біль у горлі та артралгії [(у 9 (25,0 %)], лихоманка, кашель та міалгії [(у 5 (13,9 %)], біль у животі та висипка [(у 2 (5,6 %)]; у 2 (5,6 %) реєструвались випадки смерті від COVID-19 серед членів родини; більшість [(30 (83,3 %)]; перехворіли в зимовий період 2020-2021 року; наявність постковідних симптомів мали 20 (55,6 %) респондентів, включаючи слабкість [(у 18 (50,0 %)]; зниження фізичної активності [(у 11 (30,6 %)]; головний біль [(у 7 (19,4 %)]; аносмія протягом місяця [(у 4 (11,1 %)] та дисгевзія [(у 7 (19,4 %)].

Серед обстежених дітей рекурентними респіраторними захворюваннями до 6 разів на рік хворіли 31 (86,1 %) дітей, за останні 2 місяці – 5 (13,9 %) дітей.

При об'єктивному огляді дітей серед скарг реєструвались: періодична головна біль у 8 (22, 2%) дітей, підвищена втома у 12 (33,3 %) та порушення нічного сну (у 16,6 %) дітей.

В таблиці 2.114 представлено розподіл обстежених дітей за рівнем АП. Як видно з отриманих даних більшість дітей мали напруження адаптаційних можливостей (55,6 %), а незадовільний АП та зрив адаптації - 22,2 % та 11,1 %, відповідно. Це свідчить про високу вірогідність розвитку захворювань при значному навантаженні, яке не відповідає фізіологічним можливостям майже у третини школярів.

Призначення лікувально-профілактичних заходів школярам дозволило достовірно збільшити на 44,5 % кількість дітей з задовільною адаптацією та зменшити на 27,9 % - з напруженням. Це також супроводжувалось вірогідним зменшенням скарг на головний біль, втому та порушення нічного сну. Лише у 3 (8,3 %) дітей зберігались рідкий головний біль та порушення нічного сну. При опитуванні підвищену втому не зазначене жодним школярем.

При вивченні функціональних можливостей дітей важливим є врахування психологічної складової, що є однією з головних причин дезадаптації дітей.

В таблиці 2.115 представлено результати вивчення психологічних особливостей обстежених дітей на тлі ЛПЗ. Як видно з наведених даних в таблиці

2.115, серед анкетованих дітей за шкалою Спілберга-Ханіна встановлена висока тривожність у 20 (55,6 %) дітей.

Щодо депресії встановлено, що у 4 (11,1 %) дітей визначена від легкої до помірної депресії за шкалою Бека та за шкалою Ковача - у 2 (5,6 %) визначалась прихована та у 5 (13,8 %) дітей наявна депресія. Це свідчило про переважно підвищення тривожного стану серед школярів, що вносило додатковий вклад в дезадаптацію обстежених дітей і можливо відображало спробу адаптації до нових соціальних обмежень. На тлі проведених ЛПЗ вірогідно зменшилось кількість дітей з високою тривожністю в 2 рази та підвищилось кількість дітей на 16,7 % без депресії . Лише у 1 (2,7 %) дівчинки визначено поглиблення депресивного стану внаслідок втрати бабусі.

Щодо захворюваності ГРЗ встановлено, що середня кількість пропусків занять в школі до ЛПЗ за останні 2 місяці становила (17,5±3,7) днів, а після − (3,2±1,5) днів, $p \leq 0,05$ (рисунок 2.49). Лише у 1 (2,7 %) хворого реєструвалось ГРЗ протягом періоду спостереження, але не SARS-Cov2 етіології.

Таким чином, проведені ЛПЗ у школярів, які перенесли COVID-19, свідчили про високу їх ефективність за рахунок підвищення адаптаційних можливостей дітей та позитивних змін емоційного стану, що супроводжувалось, також, зниженням ризику ГРЗ.

Розроблений комплекс діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за дітьми шкільного віку, які перенесли коронавірусне (SASR-Cov-2) інфікування був впроваджений в лікувальних закладах різних областей України, зокрема: Тернопільській, Львівській, Чернівецькій, Полтавській, Дніпропетровській, Київській областях та в місті Києві, що підтверджено актами впровадження (додаток 14, 15, Том II).

2.8 Визначення показників імунітету після лікувально-профілактичних заходів

Серед показників стану імунітету у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів визначалися зміни у популяції Т-лімфоцитів до та після лікування (табл. 2.116).

Таблиця 2.116 - Зміни у популяції Т лімфоцитів до та після лікування у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Показники Т лімфоцитів	До лікування (n=61)		Після лікування (n=61) SD		student
	%	*SD*	%	*SD*	t-test
Т лімфоцити (CD3+)	69,68	9,48	77,79	6,51	>0,01
Т лімфоцити активовані(CD3+) HLA-DR+	12,64	8,29	5,43	4,10	>0,01
НКТ подібні CD3+CD56+	4,53	3,79	7,99	8,23	>0,01
Т лімфоцити CD158a+	8,22	8,31	19,72	17,82	>0,01
Т лімфоцити подвійно негативні (CD3+CD4- CD8-)	3,20	7,73	1,35	8,10	0,2
Т-хелпери CD3+CD4+	42,78	9,40	49,68	10,29	>0,01
Т-хелпери активовані HLA-DR+	7,50	4,09	4,51	3,25	>0,01
Т-цитотоксичні CD3+CD8+	23,70	7,35	26,91	7,70	0,02
Т-цитотоксичні активовані HLA-DR+	22,94	16,71	11,61	7,03	>0,01
...CD56+	12,19	11,27	5,63	4,70	>0,01
CD4+/CD8+Ratio	1,98	0,74	4,21	16,74	0,3
CD3+CD8+CD56+	3,09	3,59	2,52	4,51	0,4

У ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування достовірно підвищувались/відновлювались Т лімфоцити та НКТ подібні клітини після лікування. Одночасно зростали і Т хелпери і Т цитотоксики. Знижувався рівень маркеру довготривалої активації *HLA-DR+ на Т клітинах загалом та окремо на* Т-хелперах і Т-цитотоксиках.

Також серед показників стану імунітету у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, визначалися зміни у популяції ***NK*** лімфоцитів до та після лікування (табл. 2.117).

Таблиця 2.117 - Зміни у популяції ***NK*** лімфоцитів до та після лікування у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Показники популяції NK лімфоцитів	До лікування (n=61)		Після лікування (n=61) SD		student
	%	*SD*	%	*SD*	t-test
NK лімфоцити (CD3-CD56+)	11,25	6,74	11,12	5,78	0,92
NK лімфоцити CD158a+	31,27	17,42	35,17	18,96	0,24
NK лімфоцити HLA-DR+	16,32	10,20	7,64	5,35	>0,01
NK лімфоцити CD8+	33,81	9,41	32,70	12,32	0,58
NK лімфоцити brigth CD56++	10,50	4,87	8,36	3,80	>0,01
NK лімфоцити brigth 56++ HLA-DR+	41,6	13,46	18,5	10,58	>0,01

У ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування кількість НК клітин не змінювалось. Знижувався рівень маркеру довготривалої активації *HLA-DR+ на НК клітинах та рівень цитокін-продукуючих НК CD56++*.

До та після лікування у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів визначалась експресія цитотоксичного рецептору p46 (CD335) на субпопуляціях NK лімфоцитів (табл. 2.118).

Таблиця 2.118 - Експресія цитотоксичного рецептору p46 (CD335) на субпопуляціях NK лімфоцитів до та після лікування у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Показники цитотоксичного рецептору p46 (CD335) на субпопуляціях NK лімфоцитів	До лікування (n=61)		Після лікування (n=61) SD		student
	%	*SD*	%	*SD*	t-test
NK лімфоцити p46+ (CD3-CD56+CD335+)	73,33	25,97	85,67	12,55	>0,01
NK лімфоцити (p46++CD56++)	14,34	12,94	13,51	10,44	0,70
NK лімфоцити (p46++CD56+)	17,74	13,42	20,98	12,45	0,17
NK лімфоцити (p46+/negCD56++)	11,52	9,65	9,94	9,32	0,37
NK лімфоцити (p46+/negCD56+)	56,40	23,19	55,57	20,91	0,84
Середня щільність p46+ на (CD3-CD56+CD335+)	91,94	33,54	95,76	45,86	0,61
Середня геометрична щільність p46+ на (CD3-CD56+CD335+)	58,58	24,44	61,76	36,13	0,59
Середня щільність p46+ на NK лімфоцитах	76,54	42,06	86,45	49,61	0,25
Середня геометрична щільність p46+ на NK лімфоцитах	41,51	28,41	49,75	37,03	0,19

Частка НК лімфоцитів що експресую цитотоксичний рецептор p46 (CD335) збільшувалось після лікування. Щільність p46 (CD335) на НК клітинах та частка *p46++ не змінювалася.*

Визначались зміни у субпопуляціях моноцитів (CD45+CD14+) до та після лікування у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів (табл. 2.119).

Таблиця 2.119 - Зміни у субпопуляціях моноцитів (CD45+CD14+) до та після лікування у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Показники субпопуляціях моноцитів (CD45+CD14+)	До лікування (n=61)		Після лікування (n=61) SD		student
	%	*SD*	%	*SD*	t-test
CD14+ CD16-	85,5	5,1	85,2	5,3	0,8
CD14+ CD16+	6,8	3,0	9,6	4,5	>0,01
CD14+- CD16++	1,8	1,1	0,9	0,8	>0,01

У обстежених жінок після лікування відбувалося збільшення проміжних форм моноцитів та зниження “фіброз-асоційованих” моноцитарних форм (CD14+-CD16++)

Серед проведених імунологічних досліджень у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, визначались сироваткові рівні класів імуноглобулінів (IgG IgM IgA) до та після лікування (табл. 2.120).

Таблиця 2.120 - Сироваткові рівні класів імуноглобулінів (IgG IgM IgA) до та після лікування у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Показники класів імуноглобулінів (IgG IgM IgA)	До лікування (n=61)		Після лікування (n=61) SD		student
	%	SD	%	SD	t-test
IgG (г/л)	18,59	2,30	16,05	1,25	>0,01
IgA(г/л)	2,91	0,84	2,39	0,46	>0,01
IgM(г/л)	1,33	0,16	1,28	0,34	0,28

Позитивними змінами в стані імунітету у ЖФВ, що перенесли коронавірусне інфікування після лікування слід вважати зниження рівнів IgG та IgA це дозволяє стверджувати, що після лікування відбувалася нормалізація рівнів сироваткових основних класів імуноглобулінів.

2.9 Визначення показників обміну вітаміну D після лікувально-профілактичних заходів

Були проведені дослідження рівня вмісту вітаміну Д у сироватці крові жінок двох вікових груп (30-35 років та 35-40 років), які перенесли коронавірусну інфекцію з легким, середнім та важким ступенем перебігу захворювання та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів. Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування за віком у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.121

При обстеженні жінок вікової групи 30- 35 років до лікування установлено, що середнє значення вітаміну D становило 47,23 нМоль/л, що вказує на дефіцит цього показника. Дефіцит становив 46,6 %, недостатність становила 40 % та норма - 13,3 %

При обстеженні жінок вікової групи 35-40 років до лікування установлено, що середнє значення вітаміну D становило 46,7 нМоль/л, що вказує також на дефіцит цього показника. Дефіцит становив 53,3 %, недостатність становила 40 % та норма була відсутня.

Після лікування жінок вікової групи 30-35 років слід відмітити зростання середнього показника вмісту вітаміну D до 54,4 нМоль/л. Дефіцит був відсутній, недостатність становила 6,6 % та норма - 93,6 %

Таблиця 2.121 – Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування за віком у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Вік жінок (роки)	Загальна кількість обстежених жінок	Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування							
		Середнє значення, нМоль/ л		Дефіцит вітаміну D, нижче 50 нМоль/л, (%)		Недостатність вітаміну D, від 50 до 75 нМоль/л, (%)		Норма вітаміну D, від 75 до 125 нМоль/л, (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
30-35 років	15	47,3	54,4	7 (46,6)	-	6 (40,0)	1 (6,6)	2 (13,3)	14 (93,3)
35-40 років	15	46,7	53,0	8 (53,3)	1 (6,6)	7 (46,6)	2 (13,3)	-	12 (80,0)

Після лікування жінок вікової групи 35-40 років слід відмітити зростання середнього показника вмісту вітаміну D до 53 нМоль/л. Дефіцит становив 6,6 %, недостатність становила 13,3 % та норма – 80 %

Також були проведені дослідження рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові в залежності від ступеня тяжкості перенесеного захворювання у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів. Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування за ступенем тяжкості у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.122.

Таблиця 2.122 - Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування за ступенем тяжкості у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Ступінь перебігу захворювання	Загальна кіль-кість обстежених жінок	Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування							
		Середнє значення, нМоль/ л		Дефіцит вітаміну D, нижче 50 нМоль/л, (%)		Недостатність вітаміну D, від 50 до 75 нМоль/л, (%)		Норма вітаміну D, від 75 до 125 нМоль/л, (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Легкий	10	48,6	58,6	6 (60)	-	3 (30)	1 (10)	1 (10)	9 (90)
Середній	10	46,7	54,2	7 (70)	-	2 (20)	1 (10)	1 (10)	9 (90)
Важкий	10	42,8	50,4	7 (70)	-	3 (30)	2 (20)	-	8 (80)

У обстежених жінок до лікування середнє значення вмісту вітаміну D становило 46,03 нМоль/л при всіх перебігах хвороби, що вказує на дефіцит вмісту вітаміну D. Також дефіцит та недостатність цього показника виявлено при легкій 60 % та 30 % відповідно, при середній 70 % та 20 % відповідно та при важкій формі 70 % та 30 % відповідно. У обстежених жінок після лікування середнє значення вмісту вітаміну D становило 54,4 нМоль/л при всіх перебігах хвороби, що вказує на недостатність вмісту цього показника. Дефіцит був відсутній при всіх формах перебігу хвороби , недостатність цього показника виявлено при легкій 10 %, при середній 10 % та при важкій формі 20 %.

Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові були визначені у 26 дітей, що перенесли COVID-19 до та після лікування. Досліджувана група дітей була однієї вікової категорії і перенесли хворобу у легкій формі. Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування у обстежених дітей, що

перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.123.

Таблиця 2.123 - Показники рівня вітаміну D 25-OH в сироватці крові до та після лікування у дітей, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Діти	Загальна кількість обстежених дітей	Середнє значення, нМоль/ л	Дефіцит вітаміну D, нижче 50 нМоль/л		Недостатність вітаміну D, від 50 до 75 нМоль/л		Норма вітаміну D, від 75 до 125 нМоль/л	
			кількість	%	кількість	%	кількість	%
До лікування	26	76,15	-	-	11	42,3	15	57,7
Після лікування	26	100,27	-	-	-	-	26	100

До лікування у дітей спостерігалась недостатність вітаміну D у 42,3% усіх обстежених. Після лікування вміст вітаміну D підвищився у всіх дітей групи до референтних значень, що становило 100%.

2.10 Визначення показників згортальної системи крові після лікувально-профілактичних заходів

Активності ферментів ЛДГ та КК у сироватці крові була визначена у тих самих жінок, що перенесли коронавірусне інфікування в вікових групах від 30 до 35 років та від 35 до 40 років, які хворіли на коронавірусну інфекцію в легкому, середньому та важкому за ступенем перебігу захворювання, до та після лікування. Показники рівня креатинкінази в сироватці крові до та після лікування за віком у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після

захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.124.

Таблиця 2.124 - Визначення рівня креатинкінази в сироватці крові до та після лікування, за віком у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Вік жінок (роки)	Загальна кількість обстежених жінок	Показники рівня креатинкінази в сироватці крові до та після лікування					
		Середнє значення, Е/ л		% від норми (N=24-145Е/л)		Кількість підвищених показників, абс.ч., (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
30-35 років	15	177,8	134,0	53,4	93,3	7 (46,6)	1 (6,6)
35-40 років	15	183,5	139,5	33,3	73,3	10 (66,6)	4 (26,6)

При визначенні ферменту КК у жінок в віці від 30 до 35 років, що перенесли коронавірусне інфікування до лікування, спостерігалося підвищення рівня ферменту на 22,3 % вище від норми. Середнє значення активності ферменту при цьому було 177,8 Е/л. При визначенні ферменту КК у жінок в віці від 35 до 40 років, що перенесли коронавірусне інфікування до лікування, спостерігалося підвищення рівня ферменту на 26,5 % вище від норми. Середнє значення активності ферменту при цьому було 183,5 Е/л.

Після лікування у жінок в віці від 30 до 35 років спостерігалося зменшення середнього значення показника активності ферменту до 134 Е/л, що становить норму. Відсоток підвищених показників активності КК зменшився на 40 %.

Після лікування у жінок в віці від 35 до 40 років спостерігалося зменшення середнього значення показника активності ферменту до 139,5 Е/л, що становить норму. Відсоток підвищених показників активності КК зменшилося на 40 %.

Показники рівня КК в сироватці крові до лікування за ступенем тяжкості у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.125.

Таблиця 2.125 - Визначення рівня креатинкінази в сироватці крові до та після лікування, за ступенем тяжкості у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Ступінь перебігу захворювання	Загальна кількість обстежених жінок	Показники рівня креатинкінази в сироватці крові до та після лікування					
		Середнє значення, Е/ л		% від норми (N=24-145 Е/л)		Кількість підвищених показників, абс.ч., (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Легкий	10	158,0	130,0	50	90	5 (50)	1 (10)
Середній	10	182,5	137,0	30	80	7 (70)	2 (20)
Важкий	10	223,55	148,5	10	60	9 (90)	4 (40)

До лікування у жінок спостерігалося підвищення рівня активності ферменту КК при всіх ступенях перебігу хвороби на 50 %, 70 %, 90 % відповідно. Середнє значення активності ферменту було вище норми при всіх формах захворювання і становило 188,0 Е/л.

Після лікування спостерігалось значне зменшення рівня КК при всіх ступенях тяжкості перебігу захворювання та становило 40 %, 50 %, 50 % відповідно. Середнє значення активності ферменту зменшилось до норми при

легкій та середній формах захворювання і знизилось майже до норми при тяжкій формі захворювання і становило 138,0 Е/л.

У тих самих жінок, що перенесли коронавірусне інфікування в вікових групах від 30 до 35 років та від 35 до 40 років, які хворіли на коронавірусну інфекцію в легкому, середньому та важкому за ступенем перебігу захворювання, до та після лікування була визначена активность фермента ЛДГ у сироватці крові. Показники рівня ЛДГ в сироватці крові до та після лікування за віком у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.126.

Таблиця 2.126 - Визначення рівня лактатдегідрогенази в сироватці крові до та після лікування за віком у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Вік жінок (роки)	Загальна кількість обстежених жінок	Показники рівня лактатдегідрогенази в сироватці крові до та після лікування					
		Середнє значення, Е/ л		% від норми (N=225-450 Е/л)		Кількість підвищених показників, абс.ч., (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
30-35 років	15	504,7	314,6	8	14	7 (46,6)	1 (6,6)
35-40 років	15	584,2	408,1	5	11	10 (66,6)	4 (26,6)

При визначенні ферменту ЛДГ у жінок в віці від 30 до 35 років, хворих на коронавірусну інфекцію до лікування, спостерігалося підвищення рівня ферменту на 12,15 % вище від норми. Середнє значення активності ферменту було 504,7 Е/л.

При визначенні ферменту ЛДГ у жінок в віці від 35 до 40 років, хворих на коронавірусну інфекцію до лікування, спостерігалося підвищення рівня ферменту на 29,82% вище від норми. Середнє значення активності ферменту було 584,2 Е/л.

Після лікування у жінок в віці від 30 до 35 років спостерігалося зменшення середнього значення показника активності ферменту до 314,6 Е/л, що знаходиться в нормі. Відсоток підвищених показників активності ЛДГ зменшилося на 40 %.

Після лікування у жінок в віці від 35 до 40 років спостерігалося зменшення середнього значення показника активності ферменту до 408,1 Е/л, що знаходиться в нормі. Відсоток підвищених показників активності ЛДГ зменшилося на 40 %.

Показники рівня ЛДГ в сироватці крові до та після лікування за ступенем тяжкості у обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів представлені в таблиці 2.127.

До лікування у жінок спостерігалося підвищення рівня активності ферменту ЛДГ при всіх ступенях перебігу хвороби на 70 %, 80 %, 100 % відповідно. Середнє значення активності ферменту було вище норми при всіх формах захворювання і становило 580,8 Е/л.

Після лікування спостерігалось значне зменшення рівня ЛДГ при всіх ступенях тяжкості перебігу захворювання та становило 60 %, 70 %, 80 % відповідно.

Таблиця 2.127 - Визначення рівня лактатдегідрогенази в сироватці крові до та після лікування, за ступенем тяжкості у жінок, що перенесли COVID-19 та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів

Ступінь перебігу захворювання	Загальна кількість обстежених жінок	Показники рівня лактатдегідрогенази в сироватці крові до та після лікування					
		Середнє значення, Е/ л		% від норми (N=225-450 Е/л)		Кількість підвищених показників, абс.ч., (%)	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Легкий	10	496,8	358,6	30	90	7 (70)	1 (10)
Середній	10	552,5	409,2	20	90	8 (80)	1 (10)
Важкий	10	693,3	456,5	-	80	10 (100)	2 (20)

Середнє значення активності ферменту зменшилось до норми при легкій та середній формах захворювання і знизилось майже до норми при тяжкій формі захворювання і становило 408,1 Е/л.

ВИСНОВКИ

1. Проведені клініко-статистичні та соціологічні дослідження, щодо особливостей стану здоров'я дітей і жінок, що зазнали інфікування корона вірусом та вивчена роль медико-біологічних факторів, як факторів ризику перебігу коронавірусного інфікування є важливим для виділення дітей і жінок в групи ризику. Зокрема у дітей мають значення такі фактори: стать дитини (переважали хлопчики – ((51,7±6,5) %)), вік дитини (переважав вік 6-12 років ((55±1,9) %)), наявність повних сімей у дітей ((78,3±5,3) %), високий рівень освіти батьків ((53,3±6,4) %), працюючих ((51,7±6,5) %) та не працюючих (не працює мати ((51,7±6,5) %)) батьки, рекурентні респіраторні захворюваннями дітей (більше 6-8 епізодів за рік, які спостерігались у 1/3 обстежених дітей), супутні алергічні захворювання у ((10,0±3,9) %). При цьому, середньо-тяжкий перебіг коронавірусної хвороби виявлявся у 19 ((81,7±5,0) %) дітей, тяжку форму мали ((18,3±5,0) %) дітей, більшість дітей ((55,0±6,4) %) захворіли через контакт з хворими в сім'ї.

У жінок визначення медико-біологічних факторів, як факторів ризику перебігу коронавірусного інфікування показало, що переважають серед перехворівших жінки віком 31-35 років (40,0 %), з середньо-тяжким перебігом коронавірусної хвороби-19 (88,3 %), при цьому, в сім'ях жінок хворіли діти і чоловік ((36,7±6,2) %), серед перехворівших жінок переважали не працюючі жінки ((60,0±6,3) %), за рівнем освіти жінки мали вищу освіту ((62,5±10,1) %) та службовцями були ((54,2±10,4) %), інтенсивне психоемоційне напруження на роботі мали ((70,8±9,5) %) та профшкідливості мали ((29,2±9,5) %), хронічні вогнища інфекції у вигляді хронічного тонзиліту реєструвалися у ((10,0±3,9) %) та більшість жінок ((81,7±5,0) %) мали одну дитину та народжували фізіологічно ((96,7±2,3) %).

2. За результатами генетичних досліджень отримано дані про розподіл генотипів та алельних варіантів можуть бути використані в якості контролю для подальших досліджень за схемою випадок-контроль. Зокрема, створено Біобанк і

проведено виділення та очищення ДНК з біологічного матеріалу (лейкоцитів периферійної крові пацієнтів), розроблено діагностичні методики для аналізу генотипів за поліморфними локусами *ACE1* (I/D) 17:61565890; *IFNL4*ss469415590 ΔG/TT, *IL6* 7:22766840 -174 G/C на основі аналізу продуктів ПЛР з детекцією в кінцевій точці, а у випадку аналізу гена *IL6* 7:22766840 -174 G/C з наступним рестрикційним аналізом та на матеріалі Біобанку зразків ДНК контрольної групи було проведено генотипування за поліморфними локусами: *ACE1* (I/D) 17:61565890; *IFNL4* ss469415590 ΔG/TT, *IL6* 7:22766840 -174 G/C.

3. Гуморальна відповідь за коронавірусної інфекції має високо індивідуальні характеристики та часто не вкладається у класичні схеми первинної/вторинної відповіді, тому не варто робити висновки щодо ранньої фази за присутністю високих рівнів IgM. З іншого боку раннє виявлення позитивних та субпозитивних значень IgM може дозволити вчасно запідозрити ранній етап інфікування.

Рівні sCD25 (розчинного рецептору до ІЛ-2) підвищені у жінок та дітей, що перехворіли порівняно із здоровими індивідуумами. Їх рівні збільшені особливо у дітей та жінок із важким перебігом інфекції, злущування рецепторів робить лімфоцити нечутливими до дії ІЛ-2, що демонструє саморегуляцію імунної системи від надмірної активації.

Рівні інтерлейкіну-8 знижені у дітей і жінок що перехворіли порівняно із здоровими індивідуумами. Їх рівні значно знижені у дітей і жінок із важким перебігом інфекції, що може свідчити про виснаження активаційних ланок та перевагу супресорної регуляції внаслідок сильної активації імунної системи.

4. У жінок і дітей, що перенесли коронавірусне інфікування в організмі у спостерігається недостатність вітаміну Д, що потребує розробки лікувальних заходів для корекції цієї недостатності.

5. Перенесене коронавірусне інфікування змінює систему згортання крові в організмі жінок і дітей, що проявляється підвищенням рівня креатинкінази в плазмі крові.

6. Вивчення поширеності інфікування на SARS-Cov2 серед жінок репродуктивного віку в Україні показало, що дана категорія склала 0,7 % за 2020

рік та 0,3 % за І квартал 2021 року. Найбільша поширеність хвороби COVID-19 серед жінок репродуктивного віку в 2020 році спостерігалась в Чернівецькій (1373.93) області, м. Києві (1249.86), Рівненській (1114.44), Сумській (1104.73) та Київській (1031.58) областях, а найменша - в Луганській (133.87), Донецькій (233.31) та Кіровоградській (233.52) областях. Згідно офіційним даним за І квартал 2021 року лідерами за поширеністю були Чернівецька (749.78), Івано-Франківська (621.22), Житомирська (484.30), Вінницька (442.88), Закарпатська (431.21) області та м. Київ (304.98), а найменшу поширеність мали - Луганська (59.01), Кіровоградська (64.20) та Донецька (82.46) області.

7. Вивчення поширеності інфікування на SARS-Cov2 серед дітей в Україні показало, що дана категорія населення склала 0,12 % за 2020 рік та 0,05 % за І квартал 2021 року, а показники поширеності на 100000 дитячого населення - 688.64 та 259.82 відповідно. Серед дитячого населення відсоток зареєстрованих випадків SARS-Cov 2 інфекції склав 0,7 % за 2020 рік та 0,3 % за І квартал 2021 року, а найбільш вразливою категорією були підлітки. Висока поширеність SARS-Cov2 інфікування серед дітей в 2020 році спостерігалась в м. Києві (1428.53), Чернівецькій (1293.13), Запорізькій (1218.57) та Тернопільській (1112.37) областях, а найменша - в Кіровоградській (155.67), Луганській (160.11), Донецькій (264.46) областях. Згідно офіційним даним за І квартал 2021 року лідерами за поширеністю SARS-Cov2 інфекції серед дітей були Чернівецька (833.32), Миколаївська (408.53), Вінницька (522.16) та Житомирська (470.36) області, а найменшу мали Луганська (57.10), Кіровоградська (67.50) та Херсонська (92.90) області.

8. На основі аналізу показників захворюваності жінок фертильного віку та дітей у різних регіонах України було розроблено формулу оцінки можливості системи охорони здоров’я, надання допомоги щодо протидії поширенню та боротьбі із наслідками коронавірусної хвороби в регіонах України. Також на основі аналізу результатів підрахунків за розробленою формулою була додатково розроблена модель прогнозування ефективності реагування системи охорони здоров’я з можливістю її вільного масштабування для будь-якого регіону України та країни в цілому. Аналіз отриманих даних від обрахунку за допомогою

розробленої формули дав можливість оцінити обсяг необхідних фінансових механізмів регулювання роботи системи охорони здоров'я в умовах децентралізації та пандемії коронавірусу в України.

9. Виявлені високі показники кореляції між поширеністю захворюваності на коронавірусну хворобу у жінок фертильного віку та у дітей з особливостями фінансування областей України, а також дані про те, що досліджена модель лінійної регресії в кожному з випадків описує більше половини можливих проявів кореляційного взаємозв'язку, дозволяють стверджувати, що характер фінансової допомоги, що здійснюються за рахунок державного бюджету України у вигляді субвенції та реальний обсяг необхідного фінансування медичної галузі кожної області в залежності від валового регіонального продукту значним чином впливає на можливості сектору охорони здоров'я протидіяти поширенню нових штамів коронавірусу серед жіночого та дитячого населення України.

10. Розроблено робочу діагностичну методику – та прототип тест системи для аналізу поліморфізму I/D гена *ACE1* основану на аналізі кривих плавлення продуктів монохромної ПЛР в реальному часі з використанням інтеркалюючого барвника SYBR Green (Eva Green)

11. Встановлено негативну кореляцію між носійством поліморфного генотипа II гена *ACE1* (I/D) та чутливістю до інфікування вірусом SARS-CoV-2 серед населення України та інших країн Європи. Таким чином, даний поліморфізм можна розглядати в якості прогностичного генетичного маркера індивідуальної чутливості до інфікування SARS-CoV-2.

12. За результатами аналізу розподілу генотипів за поліморфізмом ACE1 поліморфізм I/D проведеного в групах жінок з легким та ускладненим перебігом захворювання на COVID-19 встановлено статистично достовірну різницю за розподілом генотипів серед носіїв алеля D. Таким чином доведено, що даний поліморфізм I/D може бути використаним в якості генетичного маркера тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 у жінок репродуктивного віку (OR=0.439; CI 0.1967- 0.9797).

13. Спостерігалась тенденція до зниження частки носіїв алеля T (TT+TC) – 54% в групі пацієнтів з ускладненнями в анамнезі у порівнянні з часткою індивідів з такими ж генотипами в групі дітей без ускладнень – 80%. Ця закономірність сягала статистичної значущості за критерієм Фішера (F_{ex}=0,04) при цьому показник співвідношення шансів OR=0,3 (CI 0,086-1) також мав значущій довірчий інтервал.

14. Знижена частка дітей-носіїв протекторного алеля T який призводить до продукції інтерферону λ4, якраз і може бути причиною того, що в даній групі дітей індукується менша кількість інтерферону λ в не гематологічних клітинах і, зокрема, в клітинах бронхіального епітелію. Це, в свою чергу, може призводити до ураження легенів, що спостерігається в даній групі дітей.

15. Запропоновані маркери спадкової схильності можуть бути використані для прогнозу індивідуальної чутливості до інфікування вірусом SARS-CoV-2, а також прогнозу перебігу захворювання на COVID-19 серед дітей та жінок репродуктивного віку.

16. Стан імунної системи у жінок та дітей визначає спосіб та потужність реагування на вірусну інвазію проте агресивність вірусного процесу та кількість вірусних частинок може перевищити потенціал природніх механізмів та прорвати цю первинну лінію захисту. Подальший перебіг захворювання в таких випадках залежить від швидкості формування та ефективності специфічних Т-клітинних та гуморальних механізмів. Надмірна активація природніх ланок на цьому етапі може призводити до погіршення стану організму та уповільнювати формування специфічної відповіді.

17. Важкість перебігу коронавірусної інфекції у жінок та дітей впливає на подальший стан імунної системи та часто викликає виснаження ланок природньої резистентності. Проведені дослідження показали як часті інфекції у дітей призводять до зниження активності Толл-подібних рецепторів і таким чином створюється підґрунтя до повторних захворювань, що співпадає з результатами закордонних досліджень. Результати проведених досліджень показали, що так само

відбувається за латентних цитомегаловірусних інфекцій у дорослих коли постійне напруження ланки НК та НКТ лімфоцитів призводить до їх виснаження.

18. У жінок що перехворіли на SARS-CoV-2 у легкій формі було виявлено виснаження ланки НК та НКТ лімфоцитів. Цей стан може призводити до подальшої високої чутливості до інфекцій і потребує вивчення та розробки терапевтичних схем для його коригування.

19. Виразна лімфопенія, що спостерігається під час SARS-CoV-2 є залежною від тяжкості перебігу коронавірусного інфікування, а також є предикативним маркером несприятливого клінічного перебігу хвороби.

20. Проведені дослідження рівня вітаміну D у жінок вікових груп до 30 років та після 30 років з легким і середнім перебігом хвороби показали, що у жінок, які перенесли коронавірусне інфікування спостерігається дефіцит вітаміну Д, який переважав над нормативними значеннями від 48 % до 80 %; а у дітей з важкою формою хвороби – 100 %.

21. Визначення взаємозв'язків різних досліджуваних показників виявило корелятивний зв'язок між значенням показників концентрації імуноглобулінів до коронавірусу з показниками концентрації вітаміну Д у обстежених жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування. Зокрема, коефіцієнт кореляції Пірсона між концентрацією вітаміну Д та IgG anti-Cov19 IP становив 0,33, між концентрацією вітаміну Д та IgM anti-Cov19 IP цей показник становив 0,22, а між концентрацією вітаміну Д та IgA anti-Cov19 IP цей показник становив 0,2, що вказує на зв'язок між недостатністю вітаміну Д у обстежених жінок та перебігом коронавірусної хвороби. Це також підтверджується наявністю кореляції між розчинним ферментом інтерлейкіну 2 та недостатністю вітаміну Д (показник кореляції Пірсона становив 0,31).

22. Більш ніж у 40 % обстежених жінок віком після 30 років спостерігалось підвищення рівня лактатдегідрогенази та креатинкінази при легкому і середньому перебігу хвороби. У дітей, що перенесли коронавірусне інфікування віком 11-18 років спостерігається найбільш суттєве підвищення рівня лактатдегідрогенази, яке

виявлено при тяжкому перебігу хвороби у 75 % дітей, що перехворіли на коронавірусне інфікування.

23. Отримані дані кореляційних взаємозв'язків між рівнем креатинкінази та лактатдегідрогенази у жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування вказують на більшу вірогідність розвитку кардіологічних порушень при прогнозі віддалених результатів перенесеної коронавірусної хвороби у жінок вікової групи після 30 років, та більшу вірогідність розвитку неврологічних порушень у жінок у віці до 30 років.

24. Жінки репродуктивного віку, які перенесли коронавірусне інфікування мають бути віднесені до групи ризику появи кардіологічної патології при плануванні вагітності та у випадку виснажливої фізичної роботи, або роботи пов'язаної із тривалим психоемоційним навантаженням.

25. Використання електрокардіографічних методів дослідження є найбільш точним методом у діагностиці змін міокарду, тому всім жінкам, у яких були виявлені зміни на ЕКГ було рекомендовано пройти ехографію серця.

26. У якості допоміжного методу, особливо для первинної ланки надання медичної допомоги аналіз ЕКГ дасть можливість оцінити ризик розвитку ускладнень, пов'язаних із коронавірусною хворобою, як підчас гострого запалення, так і при діагностиці віддалених результатів перенесення цього захворювання.

27. Найбільш типовими віддаленими змінами в стані серцево-судинної системи у жінок, що перенесли коронавірусне інфікування можуть бути гіпертрофія лівого шлуночка, потовщення міжшлуночкової перетинки, збільшення тиску в легеневій артерії та зменшення фракції викиду лівого шлуночка.

28. Результати проведених клініко-епідеміологічних та соціологічних досліджень дозволили визначити стан загального здоров'я у жінок, що зазнали інфікування коронавірусом, показники їх репродуктивного здоров'я та визначити клініко-статистичні, медико-біологічні, соціологічні та епігенетичні фактори ризику поширення коронавірусного інфікування. Зокрема, для поширення захворювання у жінок мають значення вік жінок, соціальний статус та умови праці, стресорні навантаження на організм та наявність шкідливих звичок.

29. Аналіз показників характеру перебігу захворювання на коронавірус у обстежених жінок та потенційних шляхів зараження на коронавірусну інфекцію показав, що значний вплив на погіршення перебігу захворювання могли спричиняти відвідування масових заходів (підвищує ризики в 1,5 рази) і стихійних ринків (підвищує ризики в 2,25 рази), зміна роботи (підвищує ризики в 9,5 рази) і знаходження на роботі в одному приміщенні трьох і більше співробітників (підвищує ризики в 3 рази), а також поїздки родичів за кордон (підвищує ризики в 14,5 рази). Отримані дані вказують на те, що значною мірою на погіршення перебігу коронавірусної хвороби впливає швидкість розвитку симптомів та швидкість захворювання родичів жінок, особливо якщо в родині були померлі від коронавірусної інфекції (підвищує ризики в 2,1 рази). Результати досліджень дозволили отримати важливі дані, що повторні захворювання на коронавріусну інфекцію також підвищують шанси погіршення її перебігу.

30. Результати проведених клініко-епідеміологічних та соціологічних досліджень дозволили визначити стан загального здоров'я у дітей, що зазнали інфікування коронавірусом та визначити клініко-статистичні, медико-біологічні, соціологічні та епігенетичні фактори ризику поширення коронавірусного інфікування. Зокрема, для поширення захворювання у дітей мають значення негативні соціальні та санітарно-гігієнічні умови мешкання, рівень життя сім'ї дитини нижче прожиткового мінімуму та незадовільний матеріальний стан сім'ї вцілому, наявність супутньої хронічної патології з хронічними вогнищами інфекції та несприятлих перинатальних факторів, шкідливі звички у батьків, частіше у вигляді тютюнопаління при якому діти були пасивними курцями.

31. Аналіз показників характеру перебігу захворювання на коронавірус у обстежених дітей та потенційних шляхів зараження на коронавірусну інфекцію показав, що: незважаючи на перевагу хлопчиків серед опитуваних дітей різних областей України не встановлено статистично вірогідного зв'язку впливу чоловічої статі на захворюваність COVID-19 у дітей, шанси інфікування на коронавірус серед дітей, які мешкають в місті порівняно з сільською місцевістю, в 7,9 разів вище, вірогідність захворювання на коронавірус (в 7,7 разів) вища у дітей, в сім'ях яких

доход складав нижче в 1,5-2 рази рівня прожиткового мінімуму, в разі коли діти не оздоровлювались та не приймали вітамін Д ризик захворювання на коронавірус у них збільшувався відповідно в 4,9 та 3,8 рази, діти, що мали супутній хронічний тонзиліт мали вірогідність захворіти в 2,9 рази вище.

32. Результати генетичних досліджень свідчать на користь того, що спостережуване вкорочення відносної середньої довжини теломер у групі пацієнтів, що перехворіли на COVID-19 може бути свідченням на користь того, що інфекція SARS-CoV-2 через вплив на епігенетичну регуляцію може безпосередньо спричинювати ерозію (зміну просторової структури теломер) в клітинах крові, зокрема, в лейкоцитах. Таким чином, визначення відносної середньої довжини теломер може бути інформативним прогностичним маркером для оцінки ризику тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 та розвитку пост-ковідного синдрому, як можливої причини передчасного старіння у жінок репродуктивного віку.

33. Наявність більш коротших за довжиною теломер у жінок може також бути молекулярним біомаркером формування антиген-специфічних ефекторних/Т-клітин пам'яті SARS-CoV-2, які виводять вірусні частинки з організму. Таким чином, Т-клітини з короткими теломерами можуть спричинювати обмеження адаптивного імунітету проти SARS-CoV-2.

34. Визначення стану імунітету, зокрема його Т-клітинна ланка після перенесеного Cov19 у жінок демонструє ознаки надмірної активації (висока HLA-DR експресія) із нагромадженням незрілих некомпетентних клітин (високі рівні подвійно негативних CD3+CD4-CD8-) та її кількісного виснаження (обох популяцій хелперів та цитотоксинів). У жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, після лікування Т-клітинна ланка відновлювалась кількісно і нормалізувалась експресія маркерів активації та частка незрілих форм. Одночасно зростала частка НКТ лімфоцитів.

35. Визначення популяції NK лімфоцитів у жінок після перенесеного Cov19 демонструвала ознаки надмірної активації (висока HLA-DR експресія) із

нагромадженням регуляторних цитокін-продукуючих клонів та їх активацією. У жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, після лікування рівні експресії маркерів активації на NK-клітинах та на NK-регуляторних (CD56++) нормалізувалися.

36. Експресія цитотоксичного рецептору (CD335) на NK-клітинах після перенесеного Cov19 у жінок демонструвала виснаження функціональних популяцій проте вона відновлювалась за 2 місяці після лікування жінок.

37. Частка "фіброз-асоційованих" моноцитів після перенесеного Cov19 у жінок достовірно зростала, проте вона нормалізувалась за 2 місяці після лікування.

38. Рівні сироваткових IgG та IgA після перенесеного Cov19 у жінок достовірно зростала, що відповідає нагромадженню факторів гострої імунної відповіді, проте вона нормалізувалась за 2 місяці після лікування жінок.

39. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, які відносились до вікової групи від 30 до 35 років вміст вітаміну D розподілявся наступним чином: дефіцит був відсутній, недостатність зменшилась на 33,3 %, а норма підвищилась на 80 %. Після лікування жінок вікової групи від 35 до 40 років дефіцит зменшився майже на 50 %, недостатність зменшилась на 33,3 %, а норма підвищилась на 80 %. Слід відмітити, що дефіцит вітаміну D найкраще коригувався у віковій групі 30-35 років.

40. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів дефіцит вітаміну D був відсутній при всіх ступенях тяжкості перебігах захворювання, а норма підвищилась на 80 %.

41. У дітей, що перенесли коронавіруснем інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, однієї вікової групи при легкому перебігу хвороби після лікування показник рівня вітаміну D збільшився до 100 %.

42. Нормалізація вмісту вітаміну D у жінок двох вікових груп (30-35 років та 35-40 років) та у дітей однієї вікової групи після лікування корона вірусної інфекції свідчить про ефективність та правильність вибору методики лікування і дозових призначень вітаміну D шляхом індивідуального підходу.

43. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, які відносились до двох вікових груп від 30 до 35 років та від 35 до 40 років після лікування спостерігалося зниження активності ферменту креатинкінази у рівних співвідношеннях (40 % та 40 %). Відсоток підвищених показників у жінок двох вікових груп активності креатинкінази зменшилося на 40 %, що є позитивним результатом впливу лікувальних заходів на стан ферментативної активності.

44. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування до отримання після захворювання розробленого комплексу лікувально-профілактичних заходів спостерігалося підвищення рівня активності ферменту креатинкенази при всіх ступенях перебігу хвороби на 50 %, 70 %, 90 % відповідно. Після лікування спостерігалось значне зменшення рівня креатинкенази при всіх ступенях тяжкості перебігу захворювання на 40 %, 50 %, 50 % відповідно, що є позитивним результатом впливу лікувальних заходів на стан ферментативної активності.

45. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування та отримували після захворювання розроблений комплекс лікувально-профілактичних заходів, які відносились до двох вікових груп від 30 до 35 років та від 35 до 40 років після лікування спостерігалося зниження активності ферменту лактатдигідрогенази у рівних співвідношеннях (40 % та 40 %). Відсоток підвищених показників у жінок двох вікових груп активності лактатдигідрогенази зменшилося на 40 %, що також є позитивним результатом впливу лікувальних заходів на стан ферментативної активності.

46. У обстежених жінок, що перенесли коронавірусне інфікування до отримання після захворювання розробленого комплексу лікувально-

профілактичних заходів спостерігалося підвищення рівня активності ферменту лактатдигідрогенази при всіх ступенях перебігу хвороби на 70 %, 80 %, 100 % відповідно. Після лікування спостерігалось значне зменшення рівня лактатдигідрогенази при всіх ступенях тяжкості перебігу захворювання на 60 %, 70 %, 80 % відповідно, що є позитивним результатом впливу лікувальних заходів на стан ферментативної активності.

47. Жінки фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування потребують пильної уваги та спостереження сімейними лікарями, лікарями-терапевтами та лікарями акушерами-гінекологами.

48. Результати проведених наукових досліджень вказують на високий рівень захворюваності жіночого населення на коронавірусну інфекцію, що потребує оптимізації спостереження за жінками фертильного віку та проведення діагностичних, лікувальних і профілактичних заходів для жінок фертильного віку, що перенесли коронавірусне інфікування в посткоронавірусному періоді для збереження їх соматичного і репродуктивного здоров'я.

49. Використання розробленого комплексу діагностичних, лікувальних та профілактичних заходів для спостереження за жінками фертильного віку, які перенесли коронавірусне інфікування дозволить підвищити ефективність лікарських дій для цієї категорії населення.

50. На підставі комплексного вивчення стану здоров'я дітей шкільного віку, які перенесли COVID-19, з урахуванням показників базового імунітету, забезпеченості вітаміном Д, згортальної системи крові розроблено та запропоновано алгоритм спостереження та комплекс лікувально-профілактичних заходів для даної групи дітей, що дозволяє підвищити ефективність відновлювального лікування, попередити розвиток постковідного синдрому та знизити ризик повторного коронавірусного інфікування.

51. Використання розробленого комплекс щодо ведення дітей під час пандемії COVID-19 доцільно впроваджувати в практичну діяльність медичних установ різних рівнів надання медичної допомоги дитячому населенню України.

52. Застосування розроблених комплексів діагностичних, лікувально-профілактичних заходів для жінок та дітей показало свою високу ефективність: у жінок вона склала 95 %, а у дітей – 96 %.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ

1. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. - PubMed - NCBI. Accessed May 17, 2020. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282461

2. Ванюшин Б., Бердышев Г. Молекулярно-генетические механизмы старения. Изд-во Медицина. Москва. 1977.

3. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020;323(13):1239-1242.

4. CDC . COVID-19 Cases, Deaths, and Trends in the US | CDC COVID Data Tracker. Centers for Disease Control and Prevention. Published March 28, 2020. https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker

5. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint J-P, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. Mech Ageing Dev. 2006;127(3):274-281.

6. McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2021;322(12):1240-1242.

7. Jenco M. Pediatric COVID-19 cases surpass ‘tragic’ 1 million mark. AAP News. Published online December 9, 2020. Accessed December 11, 2020;https://www.aappublications.org/news/2020/11/16/covid19children111620

8. CDCMMWR . Coronavirus Disease 2019 in Children - United States, February 12–April 2, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69 10.15585/mmwr.mm6914e421..

9. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Accessed December 12, 2020. https://covid19.who.int

10. Livingston E, Bucher K. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Italy. JAMA. 2020;323(14):1335-1335.

11. Tagarro A, Epalza C, Santos M, et al. Screening and severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children in Madrid, Spain. JAMA Pediatr. Published online April 8, 2020. 10.1001/jamapediatrics.2020.1346

12. Leeb RT. COVID-19 trends among school-aged children — United States, March 1–September 19, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69 10.15585/mmwr.mm6939e2

13. Patel A. Initial public health response and interim clinical guidance for the 2019 novel coronavirus outbreak — United States, December 31, 2019–February 4, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69 10.15585/mmwr.mm6905e1

14. Godfred-Cato S. COVID-19–Associated multisystem inflammatory syndrome in children - United States, March–July 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69 10.15585/mmwr.mm6932e2

15. Posfay-Barbe KM, Wagner N, Gauthey M, et al. COVID-19 in children and the dynamics of infection in families. Pediatrics. 2020;146(2). 10.1542/peds.2020-1576

16. Lu C-W, Liu X-F, Jia Z-F. 2019-nCoV transmission through the ocular surface must not be ignored. Lancet Lond Engl. 2020;395(10224):e39.

17. Goldstein E, Lipsitch M, Cevik M. On the effect of age on the transmission of SARS-CoV-2 in households, schools, and the community. J Infect Dis. 2020;(jiaa691). 10.1093/infdis/jiaa691

18. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res. 2020; 7(1): 11.

19. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. - PubMed - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32193831

20. Chen H, Guo J, Wang C, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. The Lancet. 2020;395(10226):809-815.

21. Zimmermann P, Curtis N. COVID-19 in children, pregnancy and neonates: a review of epidemiologic and clinical features. Pediatr Infect Dis J. 2020;39(6):469-477.

22. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117

23. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet. 2020;395(10223):497-506.

24. Xia W, Shao J, Guo Y, Peng X, Li Z, Hu D. Clinical and CT features in pediatric patients with COVID-19 infection: different points from adults. Pediatr Pulmonol. 2020;55(5):1169-1174.

25. Shelmerdine SC, Lovrenski J, Caro-Domínguez P, Toso S. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children: a systematic review of imaging findings. Pediatr Radiol. Published online June 18, 2020:1-14. 10.1007/s00247-020-04726-w

26. Buda N, Segura-Grau E, Cylwik J, Wełnicki M. Lung ultrasound in the diagnosis of COVID-19 infection—a case series and review of the literature. Adv Med Sci. 2020;65(2):378-385.

27. Soldati G, Demi M, Demi L. Ultrasound patterns of pulmonary edema. Ann Transl Med. 2019;7(Suppl 1):S16.

28. Shin Jie Yong Long COVID or post-COVID-19 syndrome:putative pathophysiology, risk factors, and treatment. Infectious Diseases. 2021; 53(10):737-754

29. Sekhar, JC Myopia in children post COVID-19 home confinement Indian Pediatrics.2021; 58 (6); 594-594

30. El Mezzeoui, Aftiss, FZ, Aabdi M, Bkiyar H, Housni, B Guillan barre syndrome in post Covid-19 infection in children Annals of medicine and surgery.2021; 67; DOI10.1016/j.amsu.2021.102524

31. Abi Nassif TH, Daou KN, Tannoury T, et al Cardiac involvement in a child post COVID-19: a case from LebanonBMJ Case Reports CP 2021;14:e242084.

32. Loren A. McLendon, Chethan K. Rao, Cintia Carla Da Hora, Florinda Islamovic, Fernando N. Galan Post–COVID-19 Acute Disseminated Encephalomyelitis

in a 17-Month-Old Pediatrics Jun 2021, 147 (6) e2020049678; DOI: 10.1542/peds.2020-049678

33. Khair A, Husain S, Ortiz M, Kaur G, Bean S Para and Post-COVID-19 Acute Demyelinating Disorders in Children, Expanding the Spectrum of Clinical and Radiological Characteristics. Annals Of Neurology.2021; 90; 113-114

34. Kasnakova P, Kilova K Recovery and rehabilitation of patients with COVID-19 and post-COVID-19 syndrome Kuwait Medical Journal.2021; 53 (3); 346-347

35. Barker-Davies RM, O'Sullivan O, Senaratne KPP, et al. The Stanford Hall consensus statement for post-COVID-19 rehabilitation. Br J Sports Med. 2020;54(16):949-959. doi:10.1136/bjsports-2020-102596

36. COVID-19 Interim Guidance: Return to Sports. http://services.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/clinical-guidance/covid-19-interim-guidance-return-to-sports/

37. COVID-19 Planning Considerations: Guidance for School Re-entry. http://services.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/clinical-guidance/covid-19-planning-considerations-return-to-in-person-education-in-schools

38. Gefen N, Steinhart S, Beeri M, Weiss PL. Lessons Learned during a Naturalistic Study of Online Treatment for Pediatric Rehabilitation. Int J Environ Res Public Health. 2021;18(12):6659. Published 2021 Jun 21. doi:10.3390/ijerph18126659

39. Alpcan, A., Tursun, S., & Kandur, Y. (2021). Vitamin D levels in children with COVID-19: A report from Turkey. Epidemiology and Infection, 149, E180. doi:10.1017/S0950268821001825

40. Webster KE, O'Byrne L, MacKeith S, Philpott C, Hopkins C, Burton MJ. Interventions for the prevention of persistent post-COVID-19 olfactory dysfunction. Cochrane Database of Systematic Reviews 2021, Issue 7. Art. No.: CD013877. DOI: 10.1002/14651858.CD013877.pub2. Accessed 15 October 2021.

41. Genoveva Uzunova, Stefano Pallanti & Eric Hollander Presentation and management of anxiety in individuals with acute symptomatic or asymptomatic COVID-19 infection, and in the post-COVID-19 recovery phase. International Journal of

Psychiatry in Clinical Practice, 2021; 25:2, 115-131, DOI: 10.1080/13651501.2021.1887264

42. Ali, N (2020) Role of vitamin D in preventing of COVID-19 infection, progression and severity. Journal of Infection and Public Health 13, 1373–1380.

43. Yılmaz, K and Şen, V (2020) Is vitamin D deficiency a risk factor for COVID-19 in children? Pediatr Pulmonology 55, 3595–3601.

44. Akoğlu, HA et al. (2021) Evaluation of childhood COVID-19 cases: a retrospective analysis. Journal of Pediatric Infectious Diseases 16, 091–098.

45. Manion, M et al. (2017) Vitamin D deficiency is associated with IL-6 levels and monocyte activation in HIV-infected persons. PLoS ONE 12, e0175517.

46. Zhou, Y-F et al. (2019) The association between vitamin D deficiency and community-acquired pneumonia: a meta-analysis of observational studies. Medicine 98, e17252.

47. Zhou, Y et al. (2020) Pathogenic T cells and inflammatory monocytes inref inflammatory storm in severe COVID-19 patients. National Science Review 7, 998–1002.

48. Rustecka, A.; Maret, J.; Drab, A.; Leszczyńska, M.; Tomaszewska, A.; Lipińska-Opałka, A.; Będzichowska, A.; Kalicki, B.; Kubiak, J.Z. The Impact of COVID-19 Pandemic during 2020–2021 on the Vitamin D Serum Levels in the Paediatric Population in Warsaw, Poland. Nutrients 2021, 13, 1990. https://doi.org/10.3390/nu13061990

49. Fatemeh Hadizadeh, Supplementation with vitamin D in the COVID-19 pandemic?, Nutrition Reviews, Volume 79, Issue 2, February 2021, Pages 200–208, https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa081

50. Смирнов, В. В. Эпигенетика : теоретические аспекты и практическое значение / В. В. Смирнов, Г. Е. Леонов // Лечащий врач : журн. - 2016. - № 12.

51. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature. - 2007. - Vol. 447, no. 7143. - P. 425-432. - doi:10.1038/nature05918

52. Берестяная А. Эпигеном: параллельная реальность внутри клетки. Наука и жизнь. 2017. № 8. С. 6975.

53. Riggs A. D., Martienssen R. F., Russo V. E. A. Introduction // Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation / V. E. A. Russo et al. - N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. - С. 1-4.

54. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:6622

55. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). Intern J Oncol. 2012;41:1561–9.

56. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. Genes Dev. 1997;11(21):2801–9

57. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell. 1999;97(4):503–14.

58. Melicher D, Buzas EI, Falus A. Genetic and epigenetic trends in telomere research: a novel way in immunoepigenetics. Cell Mol Life Sci. 2015;72:4095–109.

59. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and cell senescence - size matters not. EBioMedicine. 2017;21:14-20

60. Butler RN, Sprott R, Warner H, Bland J, Feuers R, Forster M et al. Biomarkers of aging: from primitive organisms to humans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004;59(6):B560-7

61. Galkin F, Mamoshina P, Aliper A, de Magalhães JP, Gladyshev VN, Zhavoronkov A. Biohorology and biomarkers of aging: current state-of-the-art, challenges and opportunities. Ageing Res Rev. 2020;60:101050.

62. Вайсерман А. М., Войтенко В. П., Мехова Л. В. Эпигенетическая эпидемиология возраст зависимых заболеваний. Онтогенез, 2011, том 42, № 1, с. 30–50

63. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. Lancet. 2003;361(9355):393–5.

64. Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011;66(2):202–13.

65. Reichert S, Stier A. Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. Biol Lett. 2017;13(12):20170463.

66. Gorenjak V, Akbar S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. The future of telomere length in personalized medicine. Front Biosci. 2018;23:1628–54.

67. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and telomere length: a general overview. Cancers. 2020;12(3):558.

68. Von Zglinicki T, Bürkle A, Kirkwood TB. Stress, DNA damage and ageing —an integrative approach. Exp Gerontol. 2001;36(7):1049–62.

69. Ogrunc M, d'Adda di Fagagna F. Never-ageing cellular senescence. Eur J Cancer. 2011;47(11):1616–22.

70. Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H_2O_2involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(7):1407-20

71. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21(3):361–70.

72. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. Free Radic Biol Med. 2002;33(1):1–14.

73. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clin Chim Acta. 2004;339(1-2):1–9.

74. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Absence of the DNA repair enzyme human 8-oxoguanine glycosylase is associated with an aggressive breast cancer phenotype. Br J Cancer. 2012;106(2):344–7.

75. Aguiar PH, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC, Peloso EF et al. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in Trypanosoma cruzi cell viability. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):e2279.

76. Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. Exp Cell Res. 1998;239(1):152–60.

77. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JHJ et al. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. PLoS Biol. 2004;2(8):E240.

78. Richter T, Saretzki G, Nelson G, Melcher M, Olijslagers S, von Zglinicki T. TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomereshortening in human fibroblasts. Mech Ageing Dev. 2007;128(4):340–5

79. Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. FEBS Lett.1999;453(3):365-8

80. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O'Callaghan N et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. PLoS One. 2014;9(10):e110963.

81. Rubio MA, Davalos AR, Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. Exp Cell Res. 2004;298(1):17-27.

82. Oexle K, Zwirner A. Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. Hum Mol Genet. 1997;6(6):905–8.

83. Serra V, Grune T, Sitte N, Saretzki G, von Zglinicki T. Telomere length as a marker of oxidative stress in primary human fibroblast cultures. AnnNY Acad Sci. 2000;908:327–30.

84. Delgado DA, Zhang C, Gleason K, Demanelis K, Chen LS, Gao J et al. The contribution of parent-to-offspring transmission of telomeres to the heritability of telomere length in humans. Hum Genet. 2019;138:49–60.

85. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. Nature Rev Gen. 2012;13(10):693–704.

86. Boccardi M, Boccardi V. Psychological wellbeing and healthy aging: focus on telomeres. Geriatrics. 2019;4(1):25.

87. Canudas S, Becerra-Tomás N, Hernández-Alonso P, Galié S, Leung C, Crous-Bou M et al. Mediterranean diet and telomere length: a systematic review and meta-analysis. Adv Nutr. 2020;11(6):1544–54.

88. Dixit S, Whooley MA, Vittinghoff E, Roberts JD, Heckbert SR, Fitzpatrick AL et al. Alcohol consumption and leukocyte telomere length. Sci Rep. 2019;9(1):1404.

89. Gorenjak V, Petrelis AM, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. Telomere length determinants in childhood. Clin Chem Lab Med. 2020;58(2):162–77.

90. Habibi N, Bianco-Miotto T, Phoi YY, Jankovic-Karasoulos T, Roberts CT, Grieger JA. Maternal diet and offspring telomere length: a systematic review. Nutr Rev. 2021;79(2):148–59.

91. Huzen J, Wong LS, van Veldhuisen DJ, Samani NJ, Zwinderman AH, Codd V et al. Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. J Intern Med. 2014;275(2):155–63.

92. Ilmonen P, Kotrschal A, Penn DJ. Telomere attrition due to infection. PLoS One. 2008;3(5):e2143.

93. Oronsky, B.; Larson, C.; Hammond, T.C.; Oronsky, A.; Kesari, S.; Lybeck, M.; Reid, T.R. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS). Clin. Rev. Allergy Immunol. 2021, 1–9.

94. Walitt, B.; Bartrum, E. A clinical primer for the expected and potential post-COVID-19 syndromes. Pain Rep. 2021, 6, 1–7.

95. Horvath, S.; Levine, A.J. HIV-1 Infection Accelerates Age According to the Epigenetic Clock. J. Infect. Dis. 2015, 212, 1563–1573.

96. Kananen, L.; Nevalainen, T.; Jylhävä, J.; Marttila, S.; Hervonen, A.; Jylhä, M.; Hurme, M. Cytomegalovirus infection accelerates epigenetic aging. Exp. Gerontol. 2015, 72, 227–229.

97. Sabry, D.; Ahmed, R.; Abdalla, S.; Fathy, W.; Eldemery, A.; Elamir, A. Braf, Kras and Helicobacter pylori epigenetic changesassociated chronic gastritis in Egyptian patients with and without gastric cancer. World J. Microbiol. Biotechnol. 2016, 32, 1–8.

98. Froidure, A.; Mahieu, M.; Hoton, D.; Laterre, P.-F.; Yombi, J.C.; Koenig, S.; Ghaye, B.; Defour, J.-P.; Decottignies, A. Short telomeres increase the risk of severe COVID-19. Aging 2020, 12, 19911–19922.

99. Alessia Mongelli , Veronica Barbi, Michela Gottardi Zamperla et.al. Evidence for Biological Age Acceleration and Telomere Shortening in COVID-19 Survivors. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6151. https://doi.org/10.3390/ijms22116151

100. Bonkowski, M.S.; Sinclair, D.A. Slowing ageing by design: The rise of NAD (+) and sirtuin-activating compounds. Nat. Rev. Mol.Cell Biol. 2016, 17, 679–690.

101. Shahmirzadi, A.A.; Edgar, D.; Liao, C.-Y.; Hsu, Y.-M.; Lucanic, M.; Wiley, C.D.; Gan, G.; Kim, D.E.; Kasler, H.G.; Kuehnemann, C.; et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. Cell Metab. 2020, 32, 447–456.

102. Ito, S.; D'Alessio, A.C.; Taranova, O.V.; Hong, K.; Sowers, L.C.; Zhang, Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nat. Cell Biol. 2010, 466, 1129–1133.

103. Atlante, S.; Mongelli, A.; Barbi, V.; Martelli, F.; Farsetti, A.; Gaetano, C. The epigenetic implication in coronavirus infection and therapy. Clin. Epigenet. 2020, 12, 1–12.

104. Sang, E.; Tian, Y.; Miller, L.; Sang, Y. Epigenetic Evolution of ACE2 and IL-6 Genes: Non-Canonical Interferon-Stimulated Genes Correlate to COVID-19 Susceptibility in Vertebrates. Genes 2021, 12, 154.

105. Li, S.; Ma, F.; Yokota, T.; Garcia, G.; Palermo, A.;Wang, Y.; Farrell, C.;Wang, Y.C.;Wu, R.; Zhou, Z.; et al. Metabolic reprogramming and epigenetic changes of vital organs in SARS-CoV-2–induced systemic toxicity. JCI Insight. 2021, 6, 1–18.

106. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Кудайбергенова И.О., Фомин В.В., Муркамилова Ж.А. Поражение мышечной системы при Covid-19. Архив внутренней медицины.2021. 11 (2): 146-153

107. E.Terpos et all., "Hematological findings and complications of Covid-19. Fm. J. Ytmatol.,P. ajh.25829, May 2020, doi: 10.1002/ajh 25829

108. V. Vadjid, P. Safavi-Naeini, S.D.Solomon and O. Vardeny."Potential Effects of Coronaviruses on the Cfrdiovascular Systems". Jama Cardiol.Mar. 2020, doi: 10.1001/ javacardio.2020.1286.

109. Shen K., Yfng Y.Diagnosis and treatment of 2019 novee coronavirus in children: a pressing issue. World J Pediatr (2020)

110. Ana L Huerta-Alardin, Joseph Varon and Haul E Marik. – Bench – to btdside review: Rhab – dovyolysis – an overview for clinicians

111. Степанова А.П., Каронова Т.Л. Эффект терапии витамином Д на маркеры воспаления у больных сахарным діабетом 2 типа и диабетической периферической нейтропенией. Сахарный діабет. 2019. 22 (5): 417-427

112. Whittfker T, Bamford A, Kenny J, Raforou V, Jones CT, Shah H et al/ Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CJV-2/ Jama/2020 Jul 21; 324 (3): 259-269/ doi: 10/1001/jama/2020/10369

113. Пархоменко А.Н., Иркин О.И., Лутай Я.М. - Роль биологических материалов в неотложной каодиологии. – Отдел реанимации и интенсивной терапии. Национальный научно-исследовательский центр «Институт кардиологии им.акад. Н.Д.Стражеско». Киев

114. Dong Y., Mo X., Hu Y. at all/ Epidemiologicae characteristics of 2143 Pediatric Patients with 2019 Coronavirus. Pisease in China Mar 18, 2020. Pediatrics

115. Каронова Т.Л., Гринева Е.Н., Никитина И.Л. и др. Распространенность дефицита витамина Д в северо-западном регионе среди жителей г. Сант-Питербурга и Петрозаводска.Остеопороз и остеопении. 2013. 16 (3): 3-7

116. Madhusmita Misra, Kathlun J. Motie Vitamin D insufficiency fnd deficiency in children and adolescents. Allessed A"pr. 11, 2015

117. V Tbadi, Aldo J. Montanj-Ljza/ Turopean Journal of Clinical Nutrition 12/05/2020. Статус витамина Д во время лечения Covid-1

118. V. Vadjid, P. Safavi-Naeini, S.D.Solomon and O. Vardeny."Potential Effects of Coronaviruses on the Cfrdiovascular Systems". Jama Cardiol.Mar. 2020, doi: 10.1001/ javacardio.2020.1286

119. Назаренко Г.И., Кишкун А."Клиническая оценка результатов лабораторных исследований"- М., Медицина, 2000.-165-166

120. Громова О.А., Торшин И.Ю. и др. О противовирусных эффектах витамина Д. Медицинский совет. 2020; (3): 152-158

121. Fischbach F.T.,Dunning M.B. A Manual of Laboratory and Diagnostic Test, 8th Ed Lippincott Williams@ Wikkins, 2008: 1344p

122. Archana Prakash, A.K. Lal, K. S. Negi. – Serum Creatine Kinase Activity in Thyroid Disorders

123. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика.- СПб, 2006.- 432с

124. Паніотто В.І., Максименко В.С., Марченко Н.М. Статистичний аналіз соціологічних даних / К.: Видавничий дім «К.М.Академія», 2004. - 270 с.

125. Castro de Moura, M.; Davalos, V.; Planas-Serra, L.; Alvarez-Errico, D.; Arribas, C.; Ruiz, M.; Aguilera-Albesa, S.; Troya, J.; Valencia-Ramos, J.; Vélez-Santamaria, V.; et al. Epigenome-wide association study of COVID-19 severity with respiratory failure. EBioMedicine 2021.

126. Koliada A.K., Krasnienkov D.S., Vaiserman A.M. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? Frontires in genetics. 2015, 6, 82 p.1-4